

Aus dem Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Rolf Müller

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg



Charakterisierung von DYRK1A als nicht-kanonischer Modulator des Hedgehog-Signalwegs

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Philipp Schneider

aus Offenbach am Main

Marburg, 2014

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am: 30.09.2014

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Helmut Schäfer

Referent: Dr. Matthias Lauth

1. Korreferent: Prof. Dr. Thomas Worzfeld

Inhalt

1	Zusammenfassung.....	1
	Summary	2
2	Einleitung	3
2.1	Der „Hedgehog“-Signalweg	3
2.1.1	Die Signaltransduktion in Vertebraten	4
2.1.1.1	Abwesenheit eines Liganden	5
2.1.1.2	Sekretion des Liganden.....	6
2.1.1.3	Aktivierung des kanonischen HH-Signalwegs in Vertebraten	7
2.1.1.4	Alternative Signalrouten im HH-Signalweg	11
2.1.2	Mit dem Hedgehog-Signalweg assoziierte Krankheitsbilder.....	12
2.2	„Dual specificity tyrosine-phosphorylation regulated“ Kinasen	14
2.2.1	Regulation von DYRKs.....	16
2.2.2	Funktionen von DYRKs.....	18
2.2.3	Mit DYRKs assoziierte Krankheiten	21
2.2.4	Regulation des AKTIN-Zytoskeletts durch DYRK1A	22
2.3	AKTIN-bindende LIM-Proteine.....	23
2.4	SRF-abhängige Transkription	24
2.4.1	Die Kofaktoren der MKL-Familie.....	25
2.4.2	Regulation der AKTIN-MKL-SRF-Achse.....	26
2.4.3	Weitere Interaktionspartner von MKL.....	27
2.4.4	Funktionen von MKL.....	28
2.5	Ziele der Arbeit	29
3	Material und Methoden	30
3.1	Material	30
3.1.1	Geräte.....	30
3.1.2	Verbrauchsmaterialien	33
3.1.3	Chemikalien	35

3.1.3.1	Allgemeine Chemikalien	35
3.1.3.2	Spezielle Chemikalien	37
3.1.4	Kits, Lösungen, Medien und Puffer	37
3.1.4.1	Allgemein.....	37
3.1.4.2	Zellkultur.....	38
3.1.4.3	Molekularbiologische Methoden.....	38
3.1.4.4	Proteinbiochemische Methoden	40
3.1.5	Enzyme	42
3.1.6	Antikörper	42
3.1.6.1	Primärantikörper	42
3.1.6.2	Sekundärantikörper für die Westernblotanalyse.....	44
3.1.6.3	Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenz	44
3.1.7	Bakterienstämme	44
3.1.8	Plasmide	45
3.1.9	Primer (Oligonukleotide)	48
3.1.9.1	Primer für die Reverse Transkription mit Omniscript™ RT 200	49
3.1.9.2	Primer für den Mykoplasmentest	49
3.1.9.3	Primer für die Sequenzierung	49
3.1.9.4	Primer für die Klonierung	49
3.1.9.5	Primer für die quantitative Echtzeit PCR.....	50
3.1.9.5.1	Humane Primer für die quantitative Echtzeit PCR	50
3.1.9.5.2	Murine Primer für die quantitative Echtzeit PCR	50
3.1.10	siRNA	51
3.1.10.1	Kontroll-siRNA	51
3.1.10.2	Humane siRNA.....	52
3.1.10.3	Murine siRNA.....	52
3.1.11	Zelllinien	54
3.1.11.1	ATCC®-Zelllinien.....	54

3.1.11.2	Andere Zelllinien.....	54
3.1.11.3	Stabile Zelllinien.....	55
3.1.12	Computerprogramme und Datenverwaltung	55
3.1.12.1	Software	55
3.1.12.2	Genom- und Protein Datenbanken	56
3.2	Methoden.....	57
3.2.1	Zellkultur.....	57
3.2.1.1	Kultivieren und Passagieren von Zellen	57
3.2.1.2	Kryokonservierung von Zellen	58
3.2.1.3	Mykoplasmen	58
3.2.1.3.1	Mykoplasmentest via PCR	58
3.2.1.3.2	Behandlung von Mykoplasmen	59
3.2.1.4	Transfektion von Zellen	59
3.2.1.4.1	Transiente Transfektion von Zellen mit Plasmid-DNA	59
3.2.1.4.1.1	Transiente Transfektion von Plasmid-DNA mit Polyethylenimin	60
3.2.1.4.1.2	Transiente Transfektion von Plasmid-DNA mit X-tremeGENE HP	61
3.2.1.4.1.3	Transiente Transfektion von Plasmid-DNA mittels Elektroporation ..	61
3.2.1.4.2	Selektion stabiler Klone aus transient transfizierten Zellen.....	61
3.2.1.4.3	Transfektion von „small interfering RNA“ (siRNA)	62
3.2.1.4.3.1	Lösen von siRNA	62
3.2.1.4.3.2	Transfektion von siRNA mittels DharmaFECT 1	62
3.2.1.4.3.3	Transfektion von siRNA mittels „Lipofectamine® RNAiMAX“	63
3.2.1.5	Behandlung von Zellen mit Stimulantien und Inhibitoren	64
3.2.1.5.1	Behandlung der Zellen mit „Smoothened Agonist“ (SAG)	64
3.2.1.5.2	Behandlung der Zellen mit rekombinantem humanen basischem Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF-2)	64
3.2.1.5.3	Behandlung der Zellen mit Harmin	65
3.2.2	Molekularbiologische Methoden.....	65
3.2.2.1	Plasmidherstellung	65

3.2.2.1.1	Herstellung kompetenter Bakterien	65
3.2.2.1.2	Transformation kompetenter Bakterien.....	66
3.2.2.1.3	Plasmidisolierung im kleinen Maßstab (Mini-Präparation).....	66
3.2.2.1.4	Plasmidisolierung im mittleren Maßstab (Midi-Präparation)	66
3.2.2.1.5	Herstellung von Kryostocks	67
3.2.2.2	Photometrische Bestimmung von Nukleinsäuren.....	67
3.2.2.3	Verdau von DNA (Restriktion).....	67
3.2.2.4	Amplifikation spezifischer DNA-Abschnitte mittels Polymerase-Ketten- Reaktion (PCR).....	68
3.2.2.5	Agarose-Gelelektrophorese	70
3.2.2.6	Aufreinigung von DNA mittels NucleoSpin®Gel and PCR Clean-up.....	71
3.2.2.7	Sequenzierung von Plasmid-DNA	71
3.2.2.8	Klonierung	71
3.2.2.8.1	Klonierung mit pEF6/V5-His TOPO® TA Expression Kit	71
3.2.2.8.2	Restriktion und Ligation.....	72
3.2.2.8.3	Einführung von Punktmutationen	73
3.2.2.8.3.1	Einführung von Punktmutationen mittels PCR	73
3.2.2.8.3.2	Einführung von Punktmutationen in Plasmid-DNA mittels QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit	73
3.2.2.8.4	Klonierungsstrategien.....	74
3.2.2.8.4.1	GLI1-S102/104/130/132A-EGFP	74
3.2.2.8.4.2	GLI1-S102/104D-130/132D-EGFP	74
3.2.2.8.4.3	pEF-DYRK2	74
3.2.2.8.4.4	pEF-DYRK3	75
3.2.2.8.4.5	pEF-DYRK4	75
3.2.2.9	Analyse von Transkripten eukaryotischer Zellen	76
3.2.2.9.1	Isolation der gesamten RNA eukaryotischer Zellen	76
3.2.2.9.2	Reverse Transkription der RNA in cDNA	76
3.2.2.9.2.1	Reverse Transkription mit Omniscript™ RT 200	76

3.2.2.9.2.2	Reverse Transkription mit iScript™ cDNA Synthesis Kit	77
3.2.2.9.3	Analyse der cDNA-Mengen mittels quantitativer Echtzeit-PCR (qPCR)	78
3.2.3	Proteinbiochemische Methoden	80
3.2.3.1	Reportergenmessung	80
3.2.3.2	Präparation von Gesamtzellextrakten	82
3.2.3.3	Proteinbestimmung mittels Pierce® 660nm Protein Assay	82
3.2.3.4	Immunpräzipitation	82
3.2.3.5	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	84
3.2.3.6	Fraktionierung von G-AKTIN und F-AKTIN	84
3.2.3.7	Westernblot.....	85
3.2.4	Fluoreszenzmikroskopie	86
3.2.4.1	Ätzen von Deckgläschen	86
3.2.4.2	Vorbereiten der Zellen für die Fluoreszenzmikroskopie	86
3.2.5	Statistische Auswertung	87
4	Ergebnisse	89
4.1	Einfluss von DYRK-Familienmitgliedern auf GLI-Transkriptionsfaktoren	89
4.2	DYRK1A aktiviert GLI1 durch Phosphorylierung und führt zu einer Translokation in den Kern	91
4.3	Auswirkungen von DYRK1A auf die Interaktion von GLI1 mit SUFU	94
4.4	Endogenes DYRK1A hat keinen Einfluss auf die Empfänglichkeit des HH-Signalwegs für SAG in NIH3T3-Zellen.....	96
4.5	Eine Depletion von DYRK1A hat nur in Zellen neuronalen Ursprungs Auswirkungen.	98
4.6	Stabile Überexpression von DYRK1A führt zu Verminderung der Signalwegsaktivität in <i>Sufu</i> ^{-/-} und <i>Ptch1</i> ^{-/-} MEFs	102
4.7	FGF-2 inhibiert den HH-Signalweg.....	104
4.8	Die Effekte von FGF-2 auf den HH-Signalweg sind nicht durch DYRK1A vermittelt ..	109
4.9	DYRK1A interagiert mit und phosphoryliert ABLIM1	111
4.10	DYRK1A zerstört das AKTIN-Zytoskelett	111
4.11	ABLIM1 und ABLIM2 stabilisieren das AKTIN-Zytoskelett.....	113

4.12	ABLIM1, ABLIM2 sowie MKL1 wirken stimulierend auf den HH-Signalweg	116
4.13	Die mit MKL1 assoziierte Demethylase KDM3A wirkt ebenfalls positiv auf den HH-Signalweg	118
5	Diskussion.....	121
5.1	Überexprimiertes DYRK1A wirkt positiv auf überexprimierte GLI1/2-Transkriptionsfaktoren	121
5.2	Die Serin 102/104- und Serin 130/132-„Cluster“ in GLI1 sind von Bedeutung für dessen Aktivierung durch DYRK1A	122
5.3	DYRK1A führt zu einer Auflösung des SUFU-GLI1-Komplexes	124
5.4	DYRK1A wirkt abhängig von Zelltyp und Zustand des HH-Signalwegs stimulierend oder inhibierend auf den HH-Signalweg.....	126
5.5	Der basische Fibroblasten-Wachstumsfaktor inhibiert den HH-Signalweg	128
5.6	Regulation des HH-Signalwegs über AKTIN-bindende LIM-Proteine	130
5.7	Positiver Effekt von MKL1 auf den HH-Signalweg mittels DNA-Remodellierung?	132
5.8	Ausblick	133
6	Anhang	135
7	Abkürzungsverzeichnis	141
8	Abbildungsverzeichnis.....	149
9	Tabellenverzeichnis	151
10	Literaturverzeichnis	152
11	Verzeichnis der akademischen Lehrer	175
12	Danksagung	176

1 Zusammenfassung

Der Hedgehog (HH)-Signalweg spielt eine besondere Rolle während der Embryonalentwicklung. Im adulten Stadium ist er bis auf wenige Ausnahmen inaktiv und eine ektopische Reaktivierung kann zur Entstehung von Krebs führen. 30 % aller Tumorerkrankungen zeigen eine gesteigerte Aktivität des HH-Signalwegs. Neben der kanonischen Aktivierung des Signalwegs durch einen HH-Liganden existieren auch alternative Routen, die in erhöhter Aktivität der Transkriptionsfaktoren der GLI-Krüppel-Familie GLI1, GLI2 und GLI3 resultieren. Hierbei deutet sich eine besondere Rolle für die „Dual specificity tyrosine-phosphorylation regulated“ Kinasen (DYRKs) an. DYRK1B und DYRK2 sind als Gegenspieler des HH-Signalwegs beschrieben. Die Literatur beschreibt DYRK1A als positiven Faktor für GLI1 durch direkte Phosphorylierung abhängig vom N-Terminus von GLI1, was aktivierende Funktionen, wie etwa eine Anreicherung von GLI1 im Zellkern, hat. Die Aufklärung dieses Mechanismus ist ein lohnendes Ziel, denn Proteinkinasen bieten ideale Zielstrukturen für hochpotente Pharmazeutika. Diese Arbeit bestätigt den positiven Effekt von transient überexprimiertem DYRK1A auf GLI1. Die Serine 102, 104, 130 und 132 sind dabei von Bedeutung, was eine Phosphorylierung dieser Aminosäuren nahelegt. Jeweils die Serine 102 und 104 sowie 130 und 132 bilden zusammen mit einem Prolin ein allgemeines Kerntranslokationssignal. Außerdem wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass DYRK1A den SUFU-GLI1-Komplex in Abhängigkeit seiner Kinaseaktivität, nicht jedoch der oben genannten Serine, auflösen kann, was auf weitere Regulationsmechanismen von GLI1 durch DYRK1A hinweist. Weitere Experimente zeigten abhängig von Zelltyp und Zustand des HH-Signalwegs unterschiedliche Funktionen von DYRK1A, die vom erwarteten stimulierenden Effekt bis hin zu einer Inhibition des Signalwegs reichten. Ein von der Gruppe durchgeführter *in vitro* Kinase „Screen“ zeigte das AKTIN-bindende LIM Protein 1 (ABLIM1) als Phosphorylierungsziel von DYRK1A und weitere Untersuchungen zeigten ABLIM1 (und ABLIM2) sowie die „downstream“ wirkenden Proteine MKL1 („Megakaryoblastic leukemia 1“) und KDM3A (Lysin-spezifische Demethylase 3A) als positive Faktoren für den HH-Signalweg. Wir vermuten, dass DYRK1A ABLIM-Proteine phosphorylieren kann und so von AKTIN-Filamenten löst. Die daraus resultierende Erhöhung des G-AKTIN-Pools führt zur Inhibition von MKL1 und so kann dieses nicht mehr in Kombination mit KDM3A bei der Expression von HH-Zielgenen mitwirken. Dies zeigt einen bisher unbekannten nicht-kanonischen Mechanismus der Regulation des HH-Signalwegs durch DYRK1A, der die beobachtete inhibitorische Rolle der Kinase erklären kann. Die Verknüpfung des HH-Signalwegs mit dem Feld der MKL1-regulierten Zielgentranskription ermöglicht eine Vernetzung mit einer Reihe anderer zellulärer Vorgänge. Die in dieser Arbeit gewonnenen neuartigen Erkenntnisse tragen weiter zur Aufklärung der komplexen Modulation des HH-Signalwegs bei und sind damit ein wichtiger Schritt für die zielgerichtete Entwicklung

von Therapieansätzen bezüglich Tumorerkrankungen, die aus einer Deregulation des HH-Signalwegs resultieren.

Summary

The Hedgehog (HH) signaling pathway plays a pivotal role during embryogenesis. Except for few exceptions it is inactive in adults and ectopic reactivation can lead to the development of cancer. 30 % of all tumors show increased HH activity. Besides canonical pathway activation by a HH ligand alternative routes leading to increased activation of the GLI-Kruppel family transcription factors GLI1, GLI2 and GLI3 exist. Here dual specificity tyrosine-phosphorylation regulated kinases (DYRKs) play emerging roles. DYRK1B and DYRK2 counteract the HH pathway. In the literature DYRK1A is characterized as a positive factor for GLI1 by direct phosphorylation depending on GLI1's N-terminus bearing activating functions such as an accumulation of GLI1 in the nucleus. The clarification of this mechanism is a worthwhile aim, since protein kinases are ideal targets for highly potent pharmaceuticals. This work confirms the positive effect of transiently overexpressed DYRK1A on GLI1. Serine 102, 104, 130 and 132 were of importance to that suggesting a phosphorylation of these amino residues. The serines 102 and 104 and also 130 and 132 each form together with a proline a general nuclear translocation signal. Besides, this work shows the disassembly of the SUFU-GLI1 complex by DYRK1A depending on its kinase activity but not on the aforementioned serine residues hinting at additional regulatory mechanisms on GLI1 by DYRK1A. Further experiments showed different effects of DYRK1A on HH signaling ranging from the expected stimulatory effect to an inhibition of the signaling pathway. An *in vitro* kinase screen performed by the group showed the ACTIN binding LIM protein 1 (ABLIM1) as phosphorylation target of DYRK1A and further investigation revealed ABLIM1 (and ABLIM2) and also the downstream effectors MKL1 (megakaryoblastic leukemia 1) and KDM3A (lysine-specific demethylase 3A) as positive factors for the HH pathway. We hypothesize that DYRK1A phosphorylates ABLIM proteins leading to their release from ACTIN filaments. The consequential increment of the G-ACTIN pool leads to an inhibition of MKL1 with the result that it no longer promotes the expression of HH target genes together with KDM3A. This shows a new non-canonical mechanism of HH pathway regulation by DYRK1A that could explain the observed inhibitory role of the kinase. The connection of HH Signaling with the field of MKL1 mediated target gene expression enables a cross-link with a number of cellular processes. The novel insights obtained in this work contribute to the clarification of the complex modulation of the HH pathway und so are an important step for the targeted development of therapeutic approaches concerning tumor diseases resulting from a deregulation of the HH pathway.

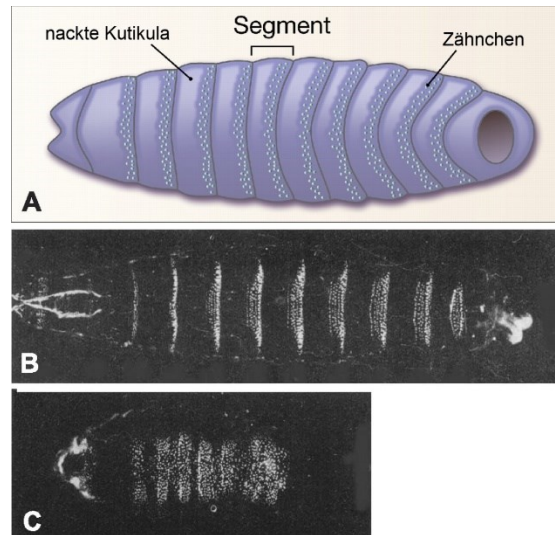
2 Einleitung

2.1 Der „Hedgehog“-Signalweg

Auf den „Hedgehog“-Signalweg wurde man zum ersten Mal aufmerksam, als embryonal letale Mutanten von *Drosophila melanogaster* (*D. melanogaster*) untersucht wurden. Eine der Mutanten mit einem homozygoten „Knockout“ für ein bestimmtes Allel wies eine phänotypisch veränderte Kutikula auf, die die Forscher an die Stacheln eines Igels erinnerte (siehe Abbildung 2.1). Das betroffene Gen wurde daraufhin „*hedgehog*“ (*hh*; Deutsch: Igel) genannt (Nusslein-Volhard und Wieschaus, 1980). Wie sich

später herausstellte, codiert das entdeckte Gen für ein sekretorisches Protein, das über die Bindung von spezifischen Rezeptoren eine bisher unbekannte Signalkaskade innerhalb der Zelle aktiviert (Ingham und McMahon, 2001). In Säugetierzellen sind bisher drei Homologe des in *D. melanogaster* entdeckten Hh bekannt. Diese sind „Sonic Hedgehog“ (SHH), „Indian Hedgehog“ (IHH) und „Desert Hedgehog“ (DHH) (Echelard et al., 1993; Ingham et al., 2011). Der HH-Signalweg ist eine Schlüsselkomponente für verschiedenste biologische Funktionen angefangen von der Embryonalentwicklung bis hin zur Gewebehomöostase (Briscoe und Thérond, 2013; Hooper und Scott, 2005). HH ist bei der Entwicklung der Gliedmaßen ein ausschlaggebender Faktor und auch für die

neuronale Spezifikation im zentralen Nervensystem von immenser Wichtigkeit (Ingham und McMahon, 2001). Eine Folge von aktivem HH-Signal ist die Expression weiterer sekretorischer Proteine, wie etwa WNT1 (Wortkreuzung aus WG für Wingless und INT1 für Integration 1), das von Zellen im Urothelium als Antwort auf SHH sekretiert wird (Shin et al., 2011). Bei der Entstehung von Gliedmaßen spielt das Zusammenwirken von SHH mit BMP („Bone morphogenic protein“) und GREM1 (Gremlin 1), ein Antagonist von BMP, eine große Rolle (Benazet et al., 2009). Bei der Ausbildung von Haarfollikeln in der Haut wirken ebenfalls sowohl SHH als auch BMP Antagonisten (Lee und Tumber, 2012). Die Interaktion von HH mit anderen Signalwegen



modifiziert nach (Nusslein-Volhard und Wieschaus, 1980; van den Brink, 2007)

Abbildung 2.1: Die *hedgehog*-Mutante von *Drosophila melanogaster*.

(A) Schema der *D. melanogaster*-Larve. Die Larve ist in verschiedene Segmente aufgeteilt. Die posteriore Hälfte jedes Segmentes zeigt eine glatte und nackte Kutikula, wohingegen die anteriore Hälfte mit so genannten Zähnchen bedeckt ist. (B) Eine Wildtyp-Larve von *D. melanogaster*. (C) Eine Larve der „*hedgehog*“-Mutante. Die glatten Abschnitte der Kutikula sind größtenteils nicht vorhanden. Das daraus resultierende Bild mit vielen zähnchenbesetzten Abschnitten erinnerte die Forscher an einen Igel (englisch: „Hedgehog“). (Nusslein-Volhard und Wieschaus, 1980; van den Brink, 2007)

zur Aufrechterhaltung oder Bildung von Gewebestrukturen zieht sich durch den gesamten Organismus. Im ausgewachsenen Organismus ist der HH-Signalweg größtenteils ausgeschaltet. Eine Ausnahme bilden hier Gewebestammzellen (Scales und de Sauvage, 2009). Neue Untersuchungen zeigen, dass dieser Signalweg entscheidend zur Krebsentstehung, vor allem bei ektopischer Reaktivierung im ausgewachsenen Organismus (Beachy et al., 2004), und zu Erbkrankheiten beitragen kann (Hui und Angers, 2011). Erste Hinweise darauf gab es durch die Untersuchung des Gorlin-Syndroms (auch Basalzellnävus-Syndrom (BCNS) genannt) (Hahn et al., 1996a; Johnson et al., 1996). Mittlerweile gibt es Hinweise, dass HH eine Rolle bei diversen Krebsarten, wie etwa Haut- und Lungenkrebs, aber auch im Gehirn und im gastrointestinalen Trakt sowie bei der Leukämie, spielt (Beachy et al., 2004). Der HH-Inhibitor Vismodegib/Erivedge wird mittlerweile in der Klinik zur Behandlung von Basalzellkarzinomen (BCC) angewandt (Dlugosz et al., 2012).

2.1.1 Die Signaltransduktion in Vertebraten

Zu den Schlüsselkomponenten des Signalwegs gehören zunächst die Liganden selbst. SHH ist dabei vor allem an der Entwicklung von Gliedmaßen und dem Notochord beteiligt (Cohn und Tickle, 1996; Jessell, 2000). Bei der Entwicklung von Knorpel und Knochen spielt IHH eine entscheidende Rolle. Die Funktionen von IHH und SHH überlappen sich bei diesen Entwicklungen teilweise. DHH hingegen ist von großer Bedeutung bei der Entwicklung von Keimzellen im Hoden und bei der Myelinisierung von Nerven im peripheren Nervensystem (Briscoe und Therond, 2013). Weitere Kernkomponenten sind die 12-spannigen Transmembranrezeptoren „Patched 1“ (PTCH1) und „Patched 2“ (PTCH2) und das 7-spannige Transmembranprotein „Smoothed“ (SMO), das als Hauptsignaltransduktor fungiert und ein Mitglied der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) ist (Kristiansen, 2004; Robbins et al., 2012). Die Effektoren des HH-Signalwegs sind die Mitglieder der GLI-Krüppel-Familie. In Vertebraten sind dies GLI1, GLI2 und GLI3. Diese Transkriptionsfaktoren besitzen eine DNA-Bindedomäne in der Form von fünf Tandem-C2H2-Zinkfingern und eine C-terminale Aktivator-domäne (Hui et al., 1994; Orenic et al., 1990; Ruppert et al., 1988), mit der sie ihre Zielgene durch eine direkte Bindung an ihre Konsensussequenz 5'-GACCACCA-3' in deren Promotor regulieren (Kinzler und Vogelstein, 1990). In Vertebraten benötigt die HH-Signalkaskade das Primärzilium (Goetz und Anderson, 2010). Diese nicht motile Ausstülpung der Zellmembran ist im Zentrosom verankert (Hildebrandt und Otto, 2005) und liegt nur in nicht-mitotischen Zellen vor, da das Zentrosom bei der Zellteilung den Spindelapparat bildet (Kobayashi und Dynlacht, 2011). Sowohl für die Aufrechterhaltung des inaktiven Zustandes, aber auch für die ersten Schritte der Transduktion des Signals innerhalb der Zelle ist das Primärzilium unabdingbar (Briscoe und Therond, 2013).

2.1.1.1 Abwesenheit eines Liganden

In der Abwesenheit des HH-Liganden befindet sich PTCH1 in Membranabschnitten rings um die Basis des Primärziliums und auch im diesem selbst. Dadurch wird verhindert, dass SMO, der Hauptsignalgeber in das Primärzilium einwandern kann (Rohatgi et al., 2007). Die Transkriptionsfaktoren GLI2 und GLI3 besitzen eine N-terminale Repressordomäne, sowie eine C-terminale Aktivator-domäne. In unstimulierten Zellen führt eine Reihe posttranslationaler Modifikationen zu einer partiellen proteosomalen Degradation des C-Terminus. Ohne die Aktivator-domäne wirken die Proteine ausschließlich als Repressor ihrer Zielgene (Pan et al., 2006). Diese Prozessierung ist effektiver für GLI3, so dass GLI3 hauptsächlich für die Aufrechterhaltung des inaktiven Zustandes des HH-Signalwegs verantwortlich gemacht wird (Litingtung und Chiang, 2000; Matise et al., 1998). GLI1 und GLI2 wirken im Gegensatz dazu vor allem als transkriptionelle Aktivatoren nach Aktivierung des Signalwegs (Bai und Joyner, 2001; Eichberger et al., 2006; Pan et al., 2006; Riobo und Manning, 2007; Wang et al., 2000).

Für diese Prozessierung wird das Primärzilium benötigt. Man nimmt an, dass GLI2, GLI3 im Komplex mit SUFU („Suppressor of fused“) durch das Primärzilium wandern, obwohl sie dort nicht direkt nachweisbar sind (Humke et al., 2010; Kim et al., 2009; Tukachinsky et al., 2010; Wen et al., 2010). Dieses Wandern wird durch das Motorprotein KIF7 (Kinesin Familienmitglied 7) vermittelt und ist notwendig für die genannte Prozessierung (Kim et al., 2009; Liu et al., 2005a). An der Basis des Primärziliums erfahren die GLI-Proteine eine Reihe von Phosphorylierungen durch Proteinkinase A (PKA), Glykogensynthase-Kinase 3 β (GSK3 β) und Caseinkinase I (CKI) (Hui und Angers, 2011; Jiang und Hui, 2008; Kise et al., 2009). Letztendlich führen diese Phosphorylierungen zu einer Ubiquitinierung durch die E3-Ligase β TRCP (Bhatia et al., 2006; Kim et al., 2007; Wang und Li, 2006; Zhang et al., 2009) und zu der beschriebenen partiellen Degradation von GLI2 und GLI3 an der Basis des Ziliums, einer proteomreichen Region (Wigley et al., 1999). Die so entstandenen Repressorformen von GLI2 und GLI3 wandern in den Nukleus und führen dort zu einer aktiven Inhibition der Zielgenexpression (siehe Abbildung 2.3).

Die GLI-Prozessierung wird durch das Einwandern von Adenylylzyklasen (AC), wie ACIII, und dem G-Protein-gekoppelte Rezeptor 161 (GPR161) ins Primärzilium verstärkt. Diese beiden Proteine führen zu einem Anstieg der Konzentration an zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP), wodurch PKA aktiviert wird. Ein Fehlen von GPR161 führt zu einer verstärkten HH-Aktivität (Mukhopadhyay et al., 2013). Wichtig für die Lokalisation dieser Proteine ins Primärzilium ist das Protein „Tubby-related protein 3“ (TULP3) und für die Adenylylzyklasen zusätzlich „Tectonic 1“ (TCTN1) an der Basis des Primärziliums (Briscoe und Therond, 2013). Diese beiden Proteine beeinflussen den HH-Signalweg und ein „Knockout“ dieser Gene führt in Mäusen zu einem ähnlichen Phänotyp, wie ein Fehlen des kompletten Ziliums (Briscoe und Therond, 2013;

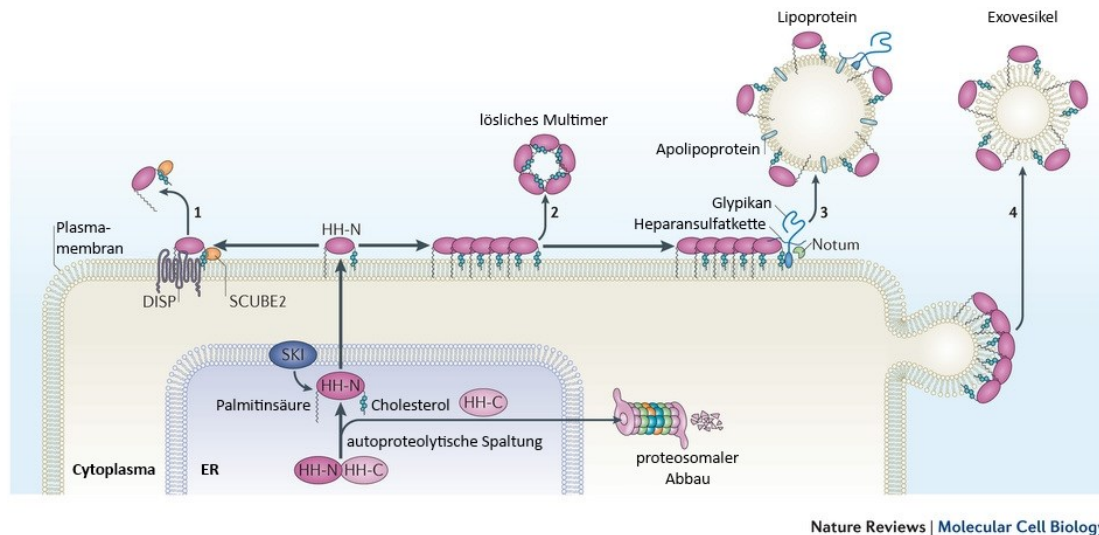
Mukhopadhyay et al., 2010; Reiter und Skarnes, 2006). Weitere posttranslationale Modifikationen wie etwa Acetylierung, Sumoylierung und der Abbau von GLI-Proteinen spielen eine große Rolle bei der Regulation des HH-Signalwegs. Neben der Ubiquitinierung durch β -TRCP sind auch die E3-Ligasen CUL3/BTB und NUMB/ITCH an der Regulation der GLI-Proteine beteiligt (Canettieri et al., 2010; Coni et al., 2013; Di Marcotullio et al., 2006; Han et al., 2012; Huntzicker et al., 2006; Jiang, 2006; Pan et al., 2006; Wang und Li, 2006).

Neben der Rolle für die Prozessierung verhindert der Komplex der GLI-Proteine mit SUFU sowohl deren Transport in den Zellkern, sowie auch deren transkriptionelle Aktivität (Humke et al., 2010; Tukachinsky et al., 2010; Wang et al., 2010; Wilson und Chuang, 2010). Ein Verlust von SUFU führt in Mausmodellen zu einer konstitutiven Aktivierung des HH-Signalwegs (Cooper et al., 2005; Svard et al., 2006).

2.1.1.2 Sekretion des Liganden

Die HH-Liganden sind sekretierte Proteine, die Distanzen von 50-300 μ M überwinden können (Zhu und Scott, 2004). Bevor der reife HH-Ligand in den extrazellulären Raum sekretiert wird, werden mehrere posttranslationale Modifikationen durchgeführt (siehe Abbildung 2.2). So kann die Aktivität und Stabilität des Liganden reguliert werden und damit auch die Distanz, die dieser dann bis zu seiner Zielzelle zurücklegen kann. Nach der Translation wird mittels einer autoproteolytischen Spaltung der C-terminale Teil des Proteins abgespalten, proteosomally abgebaut und durch eine Cholesterolgegruppe ersetzt (Mann und Beachy, 2004; Perler, 1998). Die membrangebundene O-Acyltransferase (MBOAT) „Skinny Hedgehog“ (SKI) lagert eine Palmitinsäuregruppe an den N-terminalen Teil des restlichen HH-Proteins an (Amanai und Jiang, 2001; Chamoun et al., 2001; Hofmann, 2000; Lee und Treisman, 2001; Mann und Beachy, 2004; Micchelli et al., 2002). Der fertige HH-Ligand wird in die Zellmembran transportiert und dort von dem 12-spannigen Transmembranprotein „Dispatched“ (DISP) und dem sekretierten Protein SCUBE2 („Signal peptide, CUB domain, EGF-like 2“) an seiner Cholesterolgegruppe gebunden und in den extrazellulären Raum sekretiert (Creanga et al., 2012; Tukachinsky et al., 2012).

Der HH-Ligand kann sowohl als Monomer, als auch als Multimer sekretiert werden, wodurch seine Reichweite erhöht wird (Chen et al., 2004a; Gallet et al., 2006). HH kann alternativ als Lipoproteinpartikel sekretiert werden. Dazu bindet HH in der Membran an Heparansulfatketten von Glypikanen und rekrutiert so Lipophorin Apoproteine bevor er sekretiert wird (Eugster et al., 2007; Panakova et al., 2005; Sanders et al., 2013). So wird beispielsweise die Verteilung und Aktivität von IHH bei der Verknöcherung von Knorpel in der Embryonalentwicklung reguliert (Koziel et al., 2004). Auch die Möglichkeit, dass HH in Exovesikeln von der Membran gelöst werden kann, wird diskutiert (Therond, 2012).



modifiziert nach (Briscoe und Therond, 2013)

Abbildung 2.2: Die Reifung des HH-Liganden. Der C-Terminus des HH-Liganden wird nach seiner Translation autolytisch abgespalten und durch ein Cholesterin ersetzt. Dies geschieht wahrscheinlich im endoplasmatischen Retikulum (ER). Die MBOAT-SKI lagert eine Palmitinsäuregruppe an den N-terminalen Teil des restlichen Proteins (HH-N). Der abgespaltene C-Terminus (HH-C) verlässt das ER und wird vom Proteasom abgebaut. Der HH-Ligand wird an die äußere Seite der Plasmamembran transportiert und assoziiert mit dieser über seine zwei Lipidmodifikationen. Die Sekretion des HH-Liganden kann über vier verschiedene Mechanismen geschehen. (1) DISP und SCUBE2 binden beide an den Cholesterolschwanz des HH-Proteins. Dies führt zu einer Sekretion des Liganden zusammen mit SCUBE2. (2) Mehrere reife HH-Liganden können assoziieren und als lösliches Multimer aus der Membran gelöst werden. (3) HH-Oligomere in der Membran können mit Heparansulfatketten von Glypikanten interagieren und so Lipoprotein Apolipoproteine rekrutieren. So entstehen Lipoproteinpartikel mit dem HH-Liganden. Die Sekretion dieser Partikel könnte durch die Spaltung des Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Ankers durch Notum gefördert werden. (4) Auch die Sekretion des HH-Liganden in Exovesikeln wird derzeit diskutiert (Briscoe und Therond, 2013).

2.1.1.3 Aktivierung des kanonischen HH-Signalwegs in Vertebraten

Nach der Bindung eines der HH-Liganden an PTCH1 wird der entstandene Komplex internalisiert und lysosomal abgebaut (Rohatgi et al., 2007). Die Inhibition von SMO wird aufgehoben, was letztendlich zu der Aktivierung von GLI2 und GLI3 (GLI2A, GLI3A) führt. Unter anderem geschieht dies durch die Aufhebung der Bindung der Transkriptionsfaktoren an SUFU. GLI2A und GLI3A wandern in den Nukleus und aktivieren dort ihre Zielgene (Tukachinsky et al., 2010), zu denen unter anderem GLI1 gehört (Dai et al., 1999; Lee et al., 1997). Die einzelnen Schritte sind im Folgenden aufgeführt.

Die Bindung des HH-Liganden an die Zielzelle wird unter Beihilfe verschiedener Moleküle vor allem durch den Hauptrezeptor PTCH1 vermittelt (Stone et al., 1996), der SMO, den Hauptsignaltransduktor, inhibiert (Taipale et al., 2002). Neben PTCH1 gibt es noch weitere Korezeptoren, die für eine effiziente Bindung des HH-Liganden benötigt werden. Diese sind „CAM-related/downregulated by oncogenes“ (CDO), „Brother of CDO“ (BOC) und „Growth arrest-specific“ (GAS1). CDO und BOC sind Transmembranproteine mit einer Transmembrandomäne. GAS1 befindet sich im extrazellulären Raum und ist mittels eines Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker in der Membran verankert. Diese Proteine besitzen

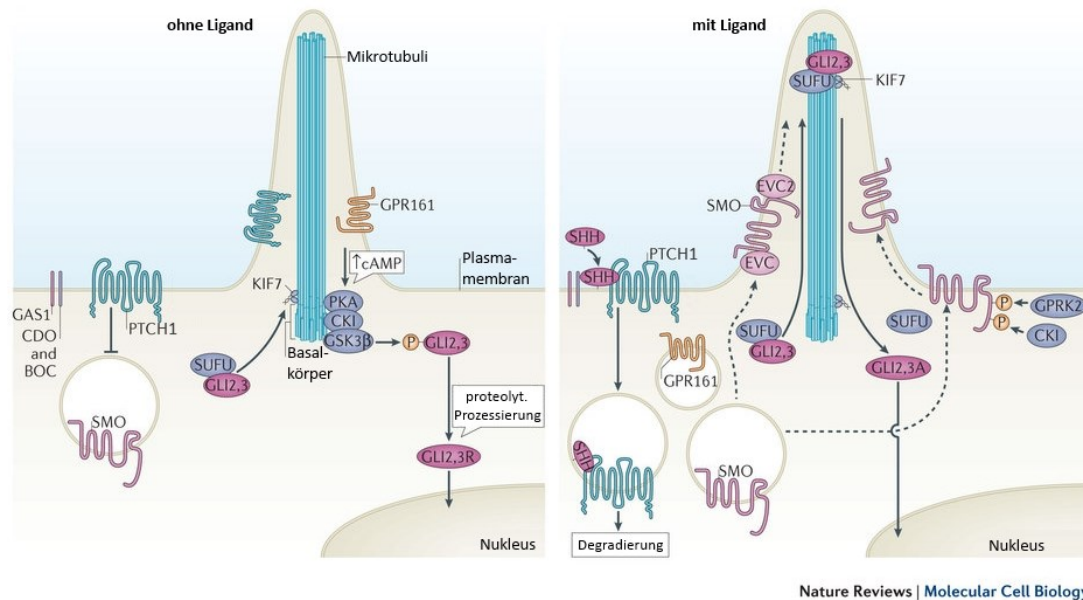
teilweise redundante Funktionen, denn der HH-Signalweg kommt nur in Abwesenheiten aller drei Proteine komplett zum Erliegen. Sie binden sowohl HH als auch PTCH1 und bilden so einen Multirezeptorkomplex. Im Gegensatz zu PTCH1, das den Signalweg inhibiert, haben die Korezeptoren eine stimulatorische Funktion im Signalweg (Allen et al., 2011; Beachy et al., 2010; Izzi et al., 2011).

Weitere Moleküle, die die Bindung von HH an die Rezeptoren regulieren, sind das HH-interagierende Protein (HHIP), das mit PTCH1 um die Bindung von HH konkurriert, Glypikan 3 (GPC3) (Capurro et al., 2008), welches ebenfalls inhibitorisch auf die Bindung von HH an PTCH1 wirkt. GPC5 und andere Heparansulfatproteoglykane wirken im Gegensatz dazu eher fördernd auf die Bindung von HH an PTCH1 (Li et al., 2011; Witt et al., 2013).

Der genaue Mechanismus, über den SMO durch PTCH1 inhibiert wird, ist ebenso wie die Aktivierung des Signalwegs nach Bindung des HH-Liganden noch unbekannt. Im Normalfall werden GPCRs, zu denen SMO gehört, über die Bindung eines oder mehrerer Liganden an ihre extrazelluläre Domäne aktiviert (Kristiansen, 2004; Marinissen und Gutkind, 2001). Die Tatsache, dass die Inhibition von SMO durch PTCH1 eher katalytischer als stöchiometrischer Natur ist, führt zu der Vermutung, dass PTCH1 die Bindung intrazellulärer Liganden an SMO reguliert, möglicherweise über deren Konzentration (Chen et al., 2002a; Taipale et al., 2002). PTCH1 zeigt eine starke Homologie zu den bakteriellen Transportproteinen der „Resistance-nodulation-division“ (RND)-Familie (Routh et al., 2011), die durch einen Protonengradienten getrieben werden und lipophile Toxine und Schwermetalle aus der Zelle pumpen. Einige konservierte Aminosäuren sind in RNDs absolut notwendig für ihre Transportfunktion und eine Mutation der entsprechenden Aminosäuren in PTCH1 führt zu einer verminderten Aktivität des Proteins (Taipale et al., 2002). PTCH1 besitzt außerdem eine „Sterol-sensing“ Domäne (SSD) (Johnson et al., 2002; Kuwabara und Labouesse, 2002; Martin et al., 2001; Strutt et al., 2001) und Mutationen in diesem Bereich beeinflussen die Fähigkeit, die Expression von HH-Zielgenen zu regulieren, nicht aber die, HH-Liganden zu binden (Chen und Struhl, 1996). Die Homologie von PTCH1 zu RNDs und die SSD legen die Vermutung nahe, dass Sterole oder Lipide Liganden für SMO sein könnten (Khaliullina et al., 2009; Robbins et al., 2012). Neuere Studien zeigen vor allem Oxysterole als Modulatoren der SMO-Aktivität. So verhindert eine Inhibition der Cholesterolsynthese in Medulloblastomzellen die Aktivierung von GLI-Proteinen und die erneute Zugabe von Cholesterol oder einiger Oxysterole konnte die fehlende GLI-Aktivität wiederherstellen (Corcoran und Scott, 2006). Diese Oxysterole zeigten sich auch als wirksame Stimulatoren von SMO für eine maximale GLI-abhängige Transkription (Dwyer et al., 2007). Das Oxysterol 20(S)-OHC kann SMO direkt binden und die GLI-abhängige Transkription synergistisch zu SAG („Smoothed Agonist“), einem synthetischen SMO Agonisten, aktivieren. Oxysterole

könnten daher als allosterische Modulatoren von SMO wirken (Nachtergaele et al., 2012). Aber auch eine Inhibition von SMO durch mögliche Liganden wurde gezeigt. So fördert PTCH1 die Sekretion des 3 β -Hydroxysteroids (Pro-)vitamin D3, welches SMO inhibiert (Bijlsma et al., 2006). Ein weiterer Kandidat für einen solchen intrazellulären Liganden ist Phosphatidylinositol 4-Phosphat (PI4P). In *D. melanogaster* führt Ptch zu einer Reduktion der PI4P-Konzentration und die Aktivierung sowie die Lokalisation von Smo in der Membran sind abhängig von PI4P. Auch wenn der Signalweg in Vertebraten unterschiedlich ist, zeigt sich in NIH3T3-Zellen eine verminderte Antwort auf SHH nach Depletion der PI4P Kinase im Luziferaseexperiment (Yavari et al., 2010). Bekannt ist außerdem, dass die Bindung von HH an den Rezeptorkomplex zu einem Auswandern von PTCH1 aus dem Primärziliurn führt und so die Translokation von SMO in das Primärziliurn ermöglicht. Diese ist für die Aktivierung des HH-Signalwegs obligatorisch (Rohatgi et al., 2007). SMO wird dabei von entfernten Membranabschnitten und aus intrazellulären Vesikeln herantransportiert (Alcedo et al., 1996; Kristiansen, 2004; van den Heuvel und Ingham, 1996). Wie es zu einer Aktivierung der GLI-Transkriptionsfaktoren nach der Aktivierung von SMO kommt, wird immer noch erforscht. Als Mitglied der GPCRs nimmt man an, dass es eine Verbindung zu den G-Proteinen gibt (Barzi et al., 2011; Fields und Casey, 1997; Low et al., 2008; Molnar et al., 2007; Ogden et al., 2008; Philipp et al., 2008; Riobo et al., 2006b). Die bekannten Schritte bei der Aktivierung von SMO in Vertebraten sind neben der erwähnten Einwanderung ins Primärziliurn eine Änderung seiner inaktiven dimeren Konformation (Chen et al., 2010; Zhao et al., 2007b). An dieser Änderung scheint eine Reihe von Phosphorylierungen beteiligt zu sein. In *D. melanogaster* sind dafür Proteinkinase A (Pka), Caseinkinase I α und II (CkI α und CkII) und Gprc-Kinase 2 (Gprk2) (Chen et al., 2010; Jia et al., 2010; Jia et al., 2004), sowie die Proteinphosphatasen 1, 2a und 4 (Pp1, Pp2a, Pp4) verantwortlich (Jia et al., 2009; Su et al., 2011). Im Vertebraten konnten Phosphorylierungen des C-Terminus von SMO durch CKI und GPRK2 (GPCR-Kinase 2), sowie dessen Bedeutung für die Konformationsänderung gezeigt werden (Chen et al., 2011a). Jedoch fehlt sowohl die Phosphorylierungsstelle von PKA in SMO und auch ein „Knockout“ von PKA hat keinen Einfluss auf die Aktivierung von SMO (Tuson et al., 2011). Pharmakologische Inhibitoren von PKA blockieren dennoch seine Aktivierung in Vertebraten, was nahe legt, dass eine verwandte Kinase an diesen Schritten beteiligt ist (Milenkovic et al., 2009; Wilson et al., 2009). Phosphoryliertes SMO interagiert mit β -Arrestin und KIF3A. Dies führt zu der ziliären Lokalisation von SMO (Chen et al., 2004b; Kovacs et al., 2008). Aktiviertes SMO interagiert dort mit den beiden ziliären Proteinen Ellis-van Creveld Syndrom Protein (EVC) und EVC2. Diese Interaktion ist wichtig für die Aktivierung der GLI-Proteine, der genaue Mechanismus ist jedoch noch nicht bekannt (Dorn et al., 2012; Yang et al., 2012).

Die Transkriptionsfaktoren GLI2 und GLI3, und im späteren Verlauf GLI1 (Dai et al., 1999; Eichberger et al., 2006), sind die Effektoren des aktivierten HH-Signalwegs. Es ist bekannt, dass nach Aktivierung des Signalwegs GLI2 und GLI3 im Komplex mit SUFU an der Spitze des Primärziliums akkumulieren (Chen et al., 2011b; Kim et al., 2009; Wen et al., 2010) und dass dieser Prozess möglicherweise durch das Motorprotein KIF7 vermittelt wird. Denn dieses Protein kann mit GLI-Proteinen interagieren und ist für ihre effektive Prozessierung vonnöten (Cheung et al., 2009). Außerdem ändert auch dieses Protein seine Lokalisation nach einer Aktivierung des Signalwegs in die Spitze des Primärziliums (Endoh-Yamagami et al., 2009; Liem et al., 2009). Man nimmt an, dass das aktivierte SMO dort die Auflösung des GLI-SUFU-Komplexes vermittelt und die GLI-Transkriptionsfaktoren das Primärzilium verlassen können, ohne die oben beschriebene Prozessierung in ihre Repressorformen zu durchlaufen. Eine Übersicht über den Zustand bei inaktivem und aktivem kanonischem HH-Signalweg zeigt Abbildung 2.3. Im Zytoplasma gibt es weitere Mechanismen, die die nukleäre Lokalisation der GLI-Proteine regulieren. Beispielsweise kann PKA GLI1 über Phosphorylierung in dem nukleären Lokalisationssignal (NLS) im Zytoplasma zurückhalten (Sheng et al., 2006). Andere posttranslationale Modifikationen führen zu einer Umwandlung in ihre Aktivatorform und zu einer Translokation in den Zellkern, wo sie die Expression ihrer Zielgene starten (Humke et al., 2010; Tukachinsky et al., 2010; Wang et al., 2010; Zeng et al., 2010). Eine kürzlich veröffentlichte Arbeit zeigt, dass die Formierung der Repressor- sowie der Aktivatorform durch eine Reihe von Phosphorylierungen gesteuert wird. Im inaktiven Zustand des HH-Signalwegs werden GLI2 und GLI3 von PKA phosphoryliert (siehe 1.1.1.1) und zwar an sechs verschiedenen Phosphorylierungsstellen. Zur Aktivierung der GLI-Proteine müssen diese Phosphorylierungen aufgehoben werden. Die Dephosphorylierung an vier dieser Stellen sorgt für eine Blockade der Prozessierung in die Repressorform. Für die volle Aktivierung der GLI-Transkriptionsfaktoren wird jedoch die Dephosphorylierung aller sechs, sowie darauffolgende Phosphorylierung an anderen Stellen benötigt (Niewiadomski et al., 2014). Zu den regulierten Genen gehören unter anderem *PTCH1*, *PTCH2*, *HHIP*, *GAS1* und *GLI1*. Die Expression dieser Gene führt zu der Entstehung von Rückkopplungsschleifen, denn die Produkte dieser Gene sind auch an der Regulation des HH-Signalwegs beteiligt. *PTCH1* und *HHIP* sind dabei für eine negative Rückkopplung zuständig und *GLI1* für eine positive. *GAS1* wird bei aktivem HH-Signal herunterreguliert, besitzt aber eigentlich positive Auswirkungen auf den Signalweg (Hillman et al., 2011; Yang et al., 2010). Die Regulation von Genen wie *BCL2* („B cell leukemia/lymphoma 2“) (Bigelow et al., 2004), D- und E-Cyclinen (Duman-Scheel et al., 2002), *SNAI1* („Snail family zinc finger 1“) (Feldmann et al., 2007) und *IGF2* („Insulin-like growth factor 2“) (Ingram et al., 2002) führen zu einem proliferativen und antiapoptotischen Effekt bei aktivem HH-Signalweg.



modifiziert nach (Briscoe und Therond, 2013)

Abbildung 2.3: Schematischer Ablauf des HH-Signalwegs vor und nach Bindung eines HH-Liganden (hier SHH) an den Rezeptor PTCH1. Ohne Ligandenbindung sitzt PTCH1 in und um das Primärzilium und inhibiert SMO über einen bisher wenig charakterisierten Mechanismus. GLI2 und GLI3 wandern im Komplex mit SUFU durch das Primärzilium und werden durch PKA, CKI und GSK3 β phosphoryliert. GPR161 und Adenylcyclasen (nicht gezeigt) unterstützen diesen Prozess möglicherweise durch die Generierung von cAMP, was die Aktivität von PKA fördert. Dies führt zur proteolytischen Prozessierung von GLI2 und GLI3 zu ihren Repressorformen (GLI2R, GLI3R). Diese inhibieren die Zielgentranskription. Nach der Bindung von SHH an den Rezeptorkomplex aus PTCH1, CDO, BOC und GAS1 verlassen PTCH1 (und auch GPR161) das Primärzilium und SMO wird durch GPRK2 und CKI phosphoryliert und anschließend durch β ARRESTIN und KIF3A in das Primärzilium transportiert. Dort interagiert es mit EVC und EVC2 und wandert zur Spitze des Ziliums. Komplexe aus SUFU und den GLI-Transkriptionsfaktoren werden von KIF7 ebenfalls an die Spitze des Ziliums transportiert. SMO führt zu einer Dissoziation dieser Komplexe und GLI2 und GLI3 können die Prozessierung in die Repressorformen umgehen, werden in ihre Aktivatorformen umgewandelt und in den Nukleus transportiert. Dort fördern sie die Transkription ihrer Zielgene (Briscoe und Therond, 2013).

2.1.1.4 Alternative Signalrouten im HH-Signalweg

Neben dem oben genannten klassischen kanonischen HH-Signalweg gibt es auch eine Reihe von alternativen Pfaden bei der Signaltransduktion, die an verschiedenen Stellen von der beschriebenen Aktivierung abweichen. (Briscoe und Therond, 2013). Bei der Entwicklung der Nerven im Rückenmark wird SHH, PTCH1 und SMO benötigt. Allerdings kommt es nicht zu einer Transkription von Zielgenen (Bourikas et al., 2005; Charron et al., 2003), sondern es folgt eine SMO-abhängige Aktivierung von Kinasen der SRC-Familie (SFKs) (Yam et al., 2009). Ab einem bestimmten Punkt in der Neurogenese erfolgt die Regulation durch SHH über HHIP unabhängig von SMO (Bourikas et al., 2005). Auch die Chemotaxis von Fibroblasten wird durch SHH induziert. Dieser Vorgang scheint allerdings weder ein Primärzilium zu benötigen, noch führt er zu einer Regulation von Zielgenen. Statt dessen sind die kleinen monomeren Ras homologen GTPasen (RHO) Ras-verwandtes C3 Botulinumtoxinsubstrat 1 (RAC1) und RHOA involviert. Diese werden von SMO über G α -Proteine aktiviert (Bijlsma et al., 2007; Bijlsma et al., 2012; Polizio et al., 2011). PTCH1 steht im Verdacht, als „Dependence Receptor“ zu fungieren. Es wurde gezeigt, dass er in

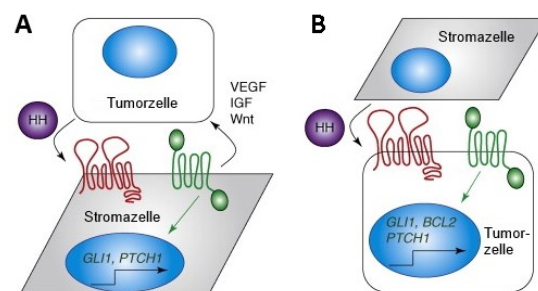
der Abwesenheit von SHH Apoptose induziert. Dies geschieht über die Interaktion mit einem Proteinkomplex, der unter anderem aus FHL2 („Four and a half LIM domains 2“) und Caspase 9 (CASP9) besteht (Mille et al., 2009; Thibert et al., 2003).

2.1.2 Mit dem Hedgehog-Signalweg assoziierte Krankheitsbilder

Gerade die Rolle während der embryonalen Entwicklung von Geweben erklärt den Einfluss des HH-Signalwegs bei erblichen Krankheiten und Fehlbildungen (Hammerschmidt et al., 1997). Eine Mutation im Gen für *SHH* kann beispielsweise zu Holoprosencephalie führen, einer pränatalen Fehlbildung des Vorderhirns (Nanni et al., 1999; Roessler et al., 1996). Weitere genetische Krankheiten, die HH assoziiert sind, sind etwa das Pallister-Hall Syndrom, bei dem es unter anderem zu Polydactylie und Organfehlfunktionen kommt (Hui und Angers, 2011).

Wie bereits erwähnt, ist der HH-Signalweg im adulten Organismus größtenteils inaktiv, da der Ligand nicht exprimiert wird (Scales und de Sauvage, 2009). Allerdings gibt es hier auch Ausnahmen, wie etwa Gewebevorläuferzellen und Stammzellen, für deren Aufrechterhaltung HH-Signale benötigt werden (Beachy et al., 2004). Eine ektopische Reaktivierung des Signalwegs in anderen Bereichen des adulten Organismus ist in vielen Fällen mit der Entstehung von Krebserkrankungen assoziiert. So zeigen etwa 30 % aller Tumore eine erhöhte Aktivität in einzelnen Teilen des HH-

Signalwegs (Lum und Beachy, 2004). Der Mechanismus, der zu dieser fälschlicherweise stattfindenden Reaktivierung führt, ist nicht in allen Fällen der gleiche. Zum einen gibt es einen Liganden-abhängigen Mechanismus. Dieser resultiert aus einer Überexpression des HH-Liganden. Nach dessen Sekretion kann es zu einer autokrinen Antwort kommen, wodurch die betroffene Zelle unabhängig von Signalen aus ihrer Umgebung wird. Häufiger ist aber ein parakriner Mechanismus. Auch hier gibt es zwei verschiedene Mechanismen. Entweder sekretieren Stromazellen den HH-Liganden ektopisch und geben damit den Tumorzellen wachstumsfördernde Signale (siehe Abbildung 2.4B). Ein Beispiel hierfür sind vor allem hämatologische Erkrankungen, wie B-Zell-Lymphome, multiple Myelome oder auch Leukämie



modifiziert nach (Scales und de Sauvage, 2009)

Abbildung 2.4: Schema der zwei Modelle der ligandenabhängigen parakrin vermittelten Antwort in Tumorzellen.

(A) Die Tumorzelle sekretiert den HH-Liganden und aktiviert den kanonischen Signalweg in Stromazellen. Diese antwortet mit anderen Wachstums- oder Überlebensfaktoren wie IGF, VEGF oder WNT und fördert so das Tumorwachstum. (B) Die Stromazelle sekretiert den HH-Liganden und aktiviert den kanonischen HH-Signalweg in Tumorzellen. Dadurch kommt es zur Expression von Zielgenen wie *GLI1*, *PTCH1* und auch *BCL2*, das das Überleben der Tumorzellen fördert (Scales und de Sauvage, 2009).

Signalwegs (Lum und Beachy, 2004). Der Mechanismus, der zu dieser fälschlicherweise stattfindenden Reaktivierung führt, ist nicht in allen Fällen der gleiche. Zum einen gibt es einen Liganden-abhängigen Mechanismus. Dieser resultiert aus einer Überexpression des HH-Liganden. Nach dessen Sekretion kann es zu einer autokrinen Antwort kommen, wodurch die betroffene Zelle unabhängig von Signalen aus ihrer Umgebung wird. Häufiger ist aber ein parakriner Mechanismus. Auch hier gibt es zwei verschiedene Mechanismen. Entweder sekretieren Stromazellen den HH-Liganden ektopisch und geben damit den Tumorzellen wachstumsfördernde Signale (siehe Abbildung 2.4B). Ein Beispiel hierfür sind vor allem hämatologische Erkrankungen, wie B-Zell-Lymphome, multiple Myelome oder auch Leukämie

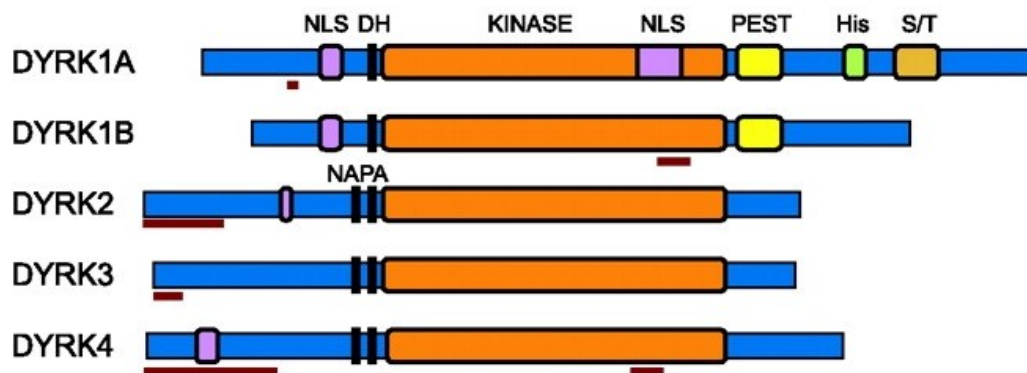
(Dierks et al., 2007; Hegde et al., 2008). Eine andere Möglichkeit ist, dass die Krebszelle HH sekretiert und daraufhin die umgebenen Stromazellen mit Wachstumsfaktoren, wie etwa VEGF („Vascular endothelial growth factor“), IGF oder WNT, antworten und damit das Tumorstadium fördern (siehe Abbildung 2.4A) (Scales und de Sauvage, 2009; Yauch et al., 2008). Ein Beispiel hierfür sind Pankreastumore, die den HH-Liganden sekretieren, was in einer parakrinen Schleife zu einer Antwort der umliegenden Stromazellen mit den oben genannten Faktoren führt (Bailey et al., 2009). Überraschenderweise findet sich auch in diesen Tumorzellen selbst ein geringes Level an GLI1, was eine Aktivierung des HH-Signalwegs voraussetzt. Der Liganden-abhängige Signalweg in diesen Zellen ist aber blockiert (Lauth et al., 2010). Es muss daher eine weitere Möglichkeit geben, den Signalweg über einen nicht-kanonischen Einfluss zu aktivieren. Eine solche Liganden-unabhängige Aktivierung kann durch Mutationen in einer regulierenden Komponente des HH-Signalwegs hervorgerufen werden. Eine „Loss-of-Function“-Mutation in einem negativen Regulator wie etwa PTCH1 oder SUFU führt dabei genauso wie eine „Gain-of-Function“-Mutation in einem positiven Regulator wie SMO oder einem der GLI-Transkriptionsfaktoren zu einer konstitutiven Aktivierung des Signalwegs (Scales und de Sauvage, 2009). Ein Verlust der Heterozygotie von *PTCH1* reicht bereits aus, um die Zellen vom Liganden unabhängig zu machen, und führt zur Entwicklung von BCCs (Hahn et al., 1996b) oder Medulloblastomen (Raffel et al., 1997). Das Gorlin-Syndrom kann ebenfalls aus einem solchen Verlust der Heterozygotie oder einer Haploinsuffizienz von *PTCH1* resultieren (Hahn et al., 1996a; Johnson et al., 1996). Diese autosomal vererbte Krankheit führt zu einem erhöhten Krebsrisiko für BCCs, Medulloblastome, Rhabdomyosarkome und Meningiome, aber auch zu Fehlern in der Entwicklung, wie etwa zweigeteilte Rippen oder ektopischer Verkalkung (Gorlin, 1987). Beinahe alle BCCs und immerhin 30 % aller Medulloblastome haben einen durch Mutationen aktivierten HH-Signalweg (Couve-Privat et al., 2002; Lam et al., 1999; Reifenberger et al., 2005; Reifenberger et al., 1998; Xie et al., 1998). Die Bedeutung von SMO und PTCH1 in der Entstehung von Krebs wird außerdem durch Mausexperimente bekräftigt. So entwickeln etwa Mäuse mit konstitutiv aktivem SMO (SMOM2) oder einem PTCH1-„Knockout“ ebenfalls BCCs, Medulloblastome und Rhabdomyosarkome (Couve-Privat et al., 2002; Hatley et al., 2012; Ignatius et al., 2012; Nitzki et al., 2011). Weiterhin wurde ein PTCH1-„Knockout“ mit der Entwicklung von gastrointestinalen stromaähnlichen Tumoren (GIST) in Verbindung gebracht (Pelczar et al., 2013). SMOM2 führt in kleinzelligem Lungenkrebs (SCLC) zu einer Vermehrung der Tumore und ein SMO-„Knockout“ zu einer Verringerung (Park et al., 2011). Außerdem gibt es mehrere Faktoren, die nicht Bestandteil des kanonischen Signalwegs sind, aber dennoch zu einer nicht-kanonischen Aktivierung führen. Ein Beispiel hierfür ist der transformierende Wachstumsfaktor β (TGF β) (Dennler et al., 2007). Wie bereits oben beschrieben, wird GLI über

Kinasen wie PKA reguliert. Weitere Kinasen, die die Aktivität von GLI-Proteinen unabhängig von HH-Liganden beeinflussen können, sind MEK, ERK, AKT (Stecca et al., 2007) und die sogenannten „Dual specificity tyrosine-phosphorylation regulated“ Kinasen (DYRKs). DYRK2 führt zu einer proteosomalen Degradation von GLI2. Der HH-Signalweg wird durch DYRK2 also negativ reguliert (Katoh und Katoh, 2008; Varjosalo et al., 2008). Auch DYRK1B hat einen negativen Einfluss auf die Aktivität des HH Signalwegs. Allerdings ist der genaue Mechanismus weitestgehend unbekannt. Die Wirkung von DYRK1B konnte aber auf einen Schritt zwischen der Derepression von SMO und der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren GLI2 und GLI3 eingeschränkt werden (Lauth et al., 2010). DYRK1A phosphoryliert den Transkriptionsfaktor GLI1 was zu einer Translokation in den Nukleus führt und dort zu einer Aktivierung des Signalwegs. Weiterhin wird die Kinase nicht über den HH-Signalweg reguliert und bietet daher einen möglichen nicht-kanonischen Mechanismus zur Aktivierung von GLI-Transkriptionsfaktoren (Mao et al., 2002). Dieser positive Einfluss benötigt die ersten 128 Aminosäuren des humanen GLI1-Proteins, denn eine Transkriptvariante, der diese Aminosäuren durch Überspringen der ersten beiden Exone fehlen, konnte durch DYRK1A nicht stimuliert werden (Shimokawa et al., 2008). Eine weitere durch RNA-Editierung veränderte Variante (GLI1^{R701G}) ist ebenfalls weniger durch DYRK1A beeinflussbar (Shimokawa et al., 2013). Vismodegib, das derzeit einzige zugelassene Arzneimittel für HH-induzierte Tumore, ist ein SMO-Inhibitor (Dlugosz et al., 2012). Wie oben erwähnt, gibt es aber auch SMO-unabhängige Mechanismen zur Induktion von GLI-Transkriptionsfaktoren, wie etwa GLI1 in Pankreastumoren (Lauth und Toftgard, 2007; Nolan-Stevaux et al., 2009). Die Aktivierung von GLI1 über DYRK1A ist ebenfalls eine solche SMO-unabhängige Regulation und als Proteinkinase bietet sie ein ideales Ziel für die Arzneimittelentwicklung.

2.2 „Dual specificity tyrosine-phosphorylation regulated“ Kinasen

„Dual specificity tyrosine-phosphorylation regulated“ Kinasen (DYRKs) finden sich in allen Eukaryoten. Diese Enzymgruppe gehört zur CMGC-Gruppe von Kinasen. Der Name der Gruppe setzt sich aus den Anfangsbuchstaben ihrer Hauptvertreter zusammen. Diese sind die Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs), Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPKs), Glykogensynthase-Kinase 3 (GSK3) und CDK-ähnliche Kinasen. Zusätzlich gehören zu ihr die Serin/Arginin-reichen Proteinkinasen, CDC2 („Cyclin-dependent protein kinase Cdk1/Cdc2“)-ähnliche Kinasen und RCK-Kinasen (benannt nach dem Gen *Rck* aus *Mus musculus*). Die DYRK-Familie innerhalb dieser Gruppe umschließt die Homöodomän-Kinasen (HIPKs), pre-mRNA prozessierende Protein 4 Kinasen (PRP4s) und die eigentlichen DYRKs (Aranda et al., 2011). Das erste entdeckte Mitglied dieser Familie war Yak1p in *Saccharomyces cerevisiae* (Garrett und Broach, 1989). In Säugetieren gibt es insgesamt fünf verschiedene Mitglieder dieser Familie, die wiederum in zwei Gruppen

unterteilt werden (Aranda et al., 2011). Die DYRK1-Gruppe mit den beiden Paralogen DYRK1A und DYRK1B zeichnet sich durch das Vorhandensein eines NLS und einer PEST (Prolin-Glutamat-Serin-Threonin)-Sequenz zur Regulation der Proteindegradation aus (Becker et al., 1998; Kinstrie et al., 2010). DYRK1A ist auf dem Chromosom 21 lokalisiert und befindet sich in der sogenannten Down-Syndrom-kritischen Region (DSCR) (Guimera et al., 1996). Untersuchungen haben gezeigt, dass diese Kinase an den phänotypischen Auswirkungen der Trisomie 21 beteiligt ist (Hammerle et al., 2003b; Park et al., 2009). In der DYRK2-Gruppe finden sich die beiden Paraloge DYRK2 und DYRK3 und zusätzlich DYRK4 (Aranda et al., 2011). Diese Mitglieder haben eine akzessorische N-terminale Autophosphorylierungsregion (NAPA). Alle fünf DYRKs haben eine DYRK-Homologiebox (DH), die eine entscheidende Rolle bei der Ausbildung der korrekten Tertiärstruktur spielt (Becker et al., 1998; Kinstrie et al., 2010; Soundararajan et al., 2013) (siehe Abbildung 2.5). Die strukturelle Zugehörigkeit zur CMGC-Gruppe zeigt sich durch einen spezifischen Abschnitt zwischen den Unterdomänen X und XI. Spezifisch für DYRKs ist eine kleine Variation in der katalytischen Schleife des Moleküls. Anstatt einer HRD (Histidin-Arginin-Aspartat)- besitzen DYRKs eine für sie spezifische HCD (Histidin-Cystein-Aspartat)-Sequenz. Ebenfalls spezifisch für DYRKs ist das YXY (Tyrosin-X-Tyrosin)-Motiv in der Aktivierungsschleife (Kannan und Neuwald, 2004). Ein Modell besagt, dass diese Tyrosine während der Translation autophosphoryliert werden (siehe 2.2.1), was für die volle Aktivierung der Kinasen benötigt wird (Becker und Joost, 1999; Kassis et al., 2000).



modifiziert nach (Aranda et al., 2011)

Abbildung 2.5: Schematische Darstellung der Proteinstruktur der 5 DYRK-Familienmitglieder in Säugetieren. NLS: nukleäres Lokalisationssignal; DH: DYRK-Homologiebox; NAPA: N-terminale Autophosphorylierungsdomäne; Kinase: Kinasedomäne; PEST: Prolin-, Glutamat-, Serin- und Threonin-reiches Motiv; His: Polyhistidinstück; S/T: Serin- und Threonin-reiche Region; rote Linien: Variable Regionen durch alternatives Spleißen (Aranda et al., 2011).

Durch unterschiedliche Erkennungssequenzen können von den verschiedenen DYRKs verschiedene Zielproteine phosphoryliert werden und so unterschiedliche zelluläre Funktionen gesteuert werden (Becker et al., 1998; Campbell und Proud, 2002). Allerdings entsprechen nicht alle Ziele diesen Sequenzen und man geht daher davon aus, dass noch andere Mechanismen zu Erkennung von Zielproteinen durch DYRKs existieren (Aranda et al., 2008; Aranda et al., 2011).

In DYRK1A entspricht diese Konsensussequenz am ehesten der Aminosäureabfolge RPX(S/T)P (Himpel et al., 2000). Wie für alle DYRKs folgt der Phosphorylierungsstelle in den Zielproteinen in den meisten Fällen ein Prolin. Für DYRK1A ist dieses Prolin jedoch nicht unbedingt erforderlich und kann auch durch andere kleine hydrophobe Aminosäuren wie etwa Valin oder Alanin ersetzt werden. Auch scheint das Vorhandensein eines Arginins drei Aminosäuren vor der Phosphorylierungsstelle von großer Wichtigkeit zu sein. In manchen Substraten befindet sich das Arginin auch zwei oder vier Stellen vor der zu phosphorylierenden Aminosäure. Dieses Arginin stabilisiert die Bindung zum Substrat durch die Bindung in einer Tasche im katalytischen Zentrum (Papadopoulos et al., 2011; Soundararajan et al., 2013). Die Konsensussequenz für DYRK1B lautet SPS(X)₂R. Zusätzlich findet sich häufig ein Arginin drei oder fünf Stellen vor der Phosphorylierungsstelle (R(X)_{2/4}SPS(X)₂R) (Friedman, 2007). DYRK2 benötigt das Prolin direkt nach dem zu phosphorylierenden Serin oder Threonin. Oftmals folgt auch ein Prolin drei Positionen hinter dieser Stelle. Das Arginin zwei bis vier Aminosäuren vor der Phosphorylierungsstelle ist nach neueren Erkenntnissen verzichtbar. Dies führt zu der Konsensussequenz (S/T)PXP (Campbell und Proud, 2002; Papadopoulos et al., 2011; Soundararajan et al., 2013). Für DYRK3 wurde die Sequenz RX(S/T)P publiziert. Das Arginin scheint jedoch auch häufig eine Aminosäure weiter N-terminal zu liegen (Campbell und Proud, 2002). Für DYRK4 ist außer der Tatsache, dass ein Arginin drei Positionen vor der Phosphorylierungsstelle wenig Relevanz besitzt, wenig bekannt (Papadopoulos et al., 2011).

2.2.1 Regulation von DYRKs

Es existiert die Annahme, dass DYRKs aktiviert werden, indem sich das unfertige Protein während der Translation in *cis* autophosphoryliert und zwar an den Tyrosinen des YXY-Motivs in der Aktivierungsschleife (Kentrup et al., 1996). Diese Phosphorylierung führt zu einer vollständigen Aktivierung der Kinase. Weitere Kinasen *in trans* sind nicht nötig. Das fertig translatierte Protein verliert die Fähigkeit Tyrosine zu phosphorylieren und kann folglich nur noch als Serin/Threonin-Kinase agieren (Lochhead et al., 2005). Nach diesem Modell sind DYRKs nach ihrer Synthese konstitutiv aktiv. Die Art der Autophosphorylierung unterscheidet sich zwischen den beiden DYRK-Gruppen. Die NAPA-Domäne der DYRK2-Gruppe stabilisiert das Protein während der Translation, um eine korrekte Autophosphorylierung zu gewährleisten. Diese Funktion ist ähnlich der von Chaperonen. Da die DYRK1-Gruppe keine solche Domäne besitzt, werden bei der Translation ihrer Mitglieder eventuell andere Chaperone benötigt (Kinstrie et al., 2010). Es zeigte sich, dass vor allem die Phosphorylierung des zweiten Tyrosins die enzymatische Aktivität der DYRKs erhöht. Mutanten von DYRK1A die anstelle des zweiten Tyrosins ein Glutamin oder ein Histidin enthalten, zeigten eine gesteigerte Enzymaktivität (Adayev et al., 2007). Diese Aminosäuren sind in der Lage, ähnliche Wasserstoffbrücken

auszubilden wie phosphoryliertes Tyrosin (Soundararajan et al., 2013). Eine Mutation dieser Aminosäure zu einem Phenylalanin in DYRK1A, DYRK1B und DYRK2 führte zu einer Verminderung der Kinaseaktivität (Adayev et al., 2007; Lee et al., 2000; Wiechmann et al., 2003). Eine Phosphatasebehandlung von rekombinantem DYRK1A führte allerdings nicht zu einem Verlust der Kinaseaktivität *in vitro* (Adayev et al., 2007). Dieses Ergebnis stellt dieses Modell zumindest teilweise in Frage.

Neuere Studien zeigen, dass DYRKs auch auf andere Weise reguliert werden können. Die DYRK Kinase Pom1p aus *Schizosacharomyces pombe* (*S. pombe*) verändert ihre Aktivität in Abhängigkeit des Zellzyklus (Bahler und Nurse, 2001). „Minibrain kinase homologue-2“ (MBK-2) eine DYRK aus *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) wird durch Interaktionen mit den Pseudophosphatasen EGG-4 und EGG-5 inhibiert und benötigt außerdem zur vollständigen Aktivierung eine weitere Phosphorylierung außerhalb der Aktivierungsschleife (Parry et al., 2009). In Säugetieren gibt es *in vivo* bis jetzt nur sehr wenige Hinweise auf solche Regulationsmechanismen und es konnte bis jetzt keine Phosphatase beschrieben werden, die eine solche Funktion ausführt (Aranda et al., 2011). Phosphorylierungsevents außerhalb dieser Schleife, die eine Steigerung der Kinaseaktivität oder auch eine Unterstützung bei der Erkennung von Zielproteinen bewirken könnten, wurden ebenfalls beobachtet. Ein Beispiel hierfür ist die Phosphorylierung von DYRK2 durch „Ataxia telangiectasia mutated“ (ATM) (Taira et al., 2010). Für DYRK1B wurde eine Regulation durch die „Mitogen-activated protein kinase kinase 3“ (MKK3) gezeigt, was ebenfalls einen Phosphorylierungsevent nahe legt (Lim et al., 2002) und DYRK1A wird als Folge einer Stimulation mit dem basischen Fibroblastenwachstumsfaktor (FGF-2) phosphoryliert (Kottakis et al., 2011). Ein Beispiel für die Interaktion von DYRKs mit regulatorischen Proteinen in Säugetieren ist die Interaktion von DYRK1A mit 14-3-3 oder „sprouty-related, EVH1 domain containing 1/2“ SPRED1/2 (Alvarez et al., 2007; Kim et al., 2004; Li et al., 2010).

Die Aktivität von DYRKs kann ebenfalls über deren Stabilität und vor allem über ihre subzelluläre Verteilung reguliert werden (Taira et al., 2010). Die DYRK1-Gruppe zeigt hier je nach Zellart deutliche Unterschiede. DYRK1A zeigt in Überexpressionsexperimenten eine prädominant nukleäre Verteilung und kolokalisiert im Kern fleckenartig mit „Serine/arginine-rich splicing factor 2“ (SRSF2). Die Tatsache, dass DYRK1A auch einige Spleißfaktoren als Substrat hat, legt eine Beteiligung der Kinase beim alternativen Spleißen nahe (Alvarez et al., 2003; Becker et al., 1998; Shi et al., 2008). Ein anderes Bild zeigt sich für endogenes Protein. In neuronalen Zellen von Menschen, Maus und Hühnchen ist es annähernd gleich verteilt. In Gliazellen zeigt es sich eher im Cytoplasma (Hammerle et al., 2003a; Marti et al., 2003; Wegiel et al., 2004). Außerdem scheint es mit der Plasmamembran im Bereich des synaptischen Spaltes assoziiert zu sein

(Aranda et al., 2008; Murakami et al., 2009). Die Verteilung von DYRK1A ist aber nicht statisch. So wandert es beispielsweise während der Differenzierung von Purkinjezellen transient in den Kern (Hammerle et al., 2003a). DYRK1B ist in vielen Zelllinien prädominant im Zellkern. Im Gegensatz zu DYRK1A ist DYRK1B dort nicht in Flecken, sondern nukleoplasmatisch verteilt (Alvarez et al., 2003; Becker et al., 1998). In Muskelfasern zeigt sich DYRK1B allerdings hauptsächlich im Cytoplasma. Einige Krebsarten, wie etwa Rhabdomyosarkome oder duktile Adenokarzinome des Pankreas (PDACs), zeigen ebenfalls eine Anreicherung von DYRK1B im Cytoplasma (Friedman, 2007). Generell scheint DYRK1B im Nukleus negativ auf den Zellzyklus zu wirken, wohingegen die Kinase im Cytoplasma vor allem das Überleben der Zelle fördert. Möglicherweise sind für diese beiden Funktionen und Verteilungen auch unterschiedliche Isoformen verantwortlich (Aranda et al., 2011). DYRK2 findet sich hauptsächlich im Cytosol, wandert aber bei genotoxischem Stress in den Kern ein (Taira et al., 2007). DYRK3 findet sich hauptsächlich im Kern (Lord et al., 2000) und die Verteilung von DYRK4 wird durch alternatives Spleißen reguliert. Durch die subzelluläre Verteilung der DYRKs wird vor allem der Zugang zu ihren Substraten reguliert und so einen Schlüsselmechanismus für ihre Kontrolle gebildet (Aranda et al., 2011).

Für die Untersuchung von Kinasen sind spezifische Inhibitoren unerlässlich. Für DYRKs gibt es nur sehr eingeschränkt geeignete Inhibitoren. Viele der Inhibitoren, die *in vitro* eingesetzt wurden, sind *in vivo* nicht verwendbar, da sie viele andere Kinasen ebenfalls inhibieren. Harmin, ein Inhibitor der Monoamin-Oxidase, kann als spezifischer DYRK1A Inhibitor eingesetzt werden. Es kompetitiert mit Adenosintriphosphat (ATP) um die Bindung an DYRK Kinasen. DYRK1A ist dadurch am stärksten betroffen, aber auch DYRK1B wird mit Harmin inhibiert. Allerdings ist die Effektivität bei DYRK1B um den Faktor 5 schwächer. DYRK2 und DYRK3 werden ebenfalls durch Harmin inhibiert, allerdings um 50-fach schwächer als DYRK1A (Bain et al., 2007; Gockler et al., 2009).

2.2.2 Funktionen von DYRKs

DYRKs stecken einen weiten Bereich an zellulären Funktionen ab. Sie spielen eine Rolle bei der Entwicklung, bei der Regulation von Zell-Proliferation und -differenzierung. Auch das Überleben einzelner Zellen und die Zellhomöostase werden von DYRKs beeinflusst. Die Kinasen steuern grundlegende Funktionen wie Transkription, sind aber auch beispielsweise bei der Endozytose beteiligt (Alvarez et al., 2007; Aranda et al., 2011; Murakami et al., 2009; Pelkmans et al., 2005; Pelkmans und Zerial, 2005). Die meisten dieser Funktionen sind abhängig von einer Phosphorylierung von Substraten durch DYRKs. Eine solche Modifikation durch DYRKs kann zu einer veränderten Enzymaktivität (Guo et al., 2010), subzellulären Lokalisation (Arron et al.,

2006; Gwack et al., 2006) oder Proteinstabilität des Zielproteins führen (Maddika und Chen, 2009). Es gibt aber auch Kinase-unabhängige Aufgaben von DYRKs. Beispielsweise können sie als Gerüstproteine dienen. DYRK2 ist ein Mitglied des EDVP-Komplexes (EDD, DDB1 und VPRBP), einer E3-Ubiquitinligase, und dient hier sowohl als Kinase für Substrate des Komplexes, ist aber auch von Bedeutung für die Formierung des Komplexes (Maddika und Chen, 2009). Ein Substrat dieses Komplexes ist das Protein TERT („Telomerase reverse transcriptase“), eine Untereinheit der Telomerase. Ein vermindertes DYRK2-Level führt zu einem geringeren Abbau dieses Proteins und somit zu einer gesteigerten Telomeraseaktivität. Dies begünstigt die Proliferation in diesen Zellen (Jung et al., 2013). Eine Phosphorylierung durch DYRKs ermöglicht oftmals eine effektivere Phosphorylierung durch andere Kinasen. DYRKs können beispielsweise die Grundlage für eine weitere Phosphorylierung durch GSK3 oder „Polo-like kinases“ (PLK) vorbereiten (Aranda et al., 2011; Cohen und Frame, 2001; Gwack et al., 2006; Nishi und Lin, 2005; Nishi et al., 2008).

Das Überleben von Zellen kann von DYRKs sowohl positiv als auch negativ reguliert werden. Die Familienmitglieder DYRK1A, DYRK1B und DYRK3 wirken positiv auf das Überleben. Eines der Ziele von DYRK1A ist die Caspase 9, die durch Phosphorylierung an Threonin 125 inhibiert wird (Seifert et al., 2008; Seifert und Clarke, 2009). Dies geschieht vor allem während der Interphase und als Antwort auf hyperosmotischen Stress. Besonders wichtig ist diese Funktion bei der Entwicklung der Retina im Auge der Maus (Laguna et al., 2008). Weiterhin kann DYRK1A und auch DYRK3 Sirtuin-1 (SIRT1) phosphorylieren. Die Deacetylase wird dadurch aktiviert und inhibiert p53. So können Zellen vor der Apoptose bei DNA-Schäden geschützt werden (Guo et al., 2010). DYRK1A kann p53 auch direkt an Serin 15 phosphorylieren (Park et al., 2010). Sowohl eine Überexpression als auch ein „Knockdown“ von DYRK1A führten in verschiedenen Arbeiten zur Erhöhung von p53-Zielgenen. Die letztendliche Auswirkung scheint abhängig vom zellulären Kontext zu sein (Park et al., 2010; Taira et al., 2007). Das proapoptotische „Huntingtin interacting protein 1“ (HIP1) wird durch eine Phosphorylierung durch DYRK1A inhibiert (Kang et al., 2005). DYRK1B ist ein wichtiger Faktor, der das Überleben sowohl in nichttransformierten Zellen sowie in Tumorzellen unterstützt. Ein möglicher Mechanismus, wie DYRK1B seine Rolle als Überlebenskinase ausführt, ist die Phosphorylierung der beiden CDK Inhibitoren p21 und p27. Phosphoryliertes p21 transloziert aus dem Kern und inhibiert im Cytoplasma proapoptotische Proteine. p27 führt nach seiner Phosphorylierung zu einem Arrest in der G₀-Phase (Deng et al., 2009; Friedman, 2007; Gao et al., 2009; Janumyan et al., 2008; Mercer et al., 2005). DYRK2 (und auch DYRK3) können p53 direkt an Serin 46 phosphorylieren. Dies führt zu einer Aktivierung der proapoptotischen Funktionen von p53 (Taira et al., 2007).

Nicht nur das Überleben, sondern auch die Differenzierung von verschiedenen Zellen wird von DYRKs gesteuert. Wie die Bedeutung von DYRK1A für die Auswirkungen einer Trisomie des Chromosoms 21 vermuten lässt, ist die Kinase von besonderer Bedeutung im Bereich der Neurogenese (Benavides-Piccione et al., 2005; Hammerle et al., 2003a). Vor allem bei der Entwicklung des Gehirns und des zentralen Nervensystems (ZNS) spielt die Kinase eine zentrale Rolle. Mäuse mit einem heterozygoten „Knockout“ von DYRK1A weisen eine verringerte Komplexität in ihren Dendriten auf (Benavides-Piccione et al., 2005). Überexpression der Kinase reduziert das Wachstum von Dendriten und die Komplexität von primären Kortexneuronen der Maus (Scales et al., 2009). Ein „Knockdown“ von DYRK1A in primären Kortexneuronen der Ratte, sowie eine Behandlung von kultivierten Neuronen aus dem Hippocampus mit Harmin zeigen ebenfalls einen vergleichbaren Phänotyp (Gockler et al., 2009; Lepagnol-Bestel et al., 2009). Diese Entdeckungen zeigen die Bedeutung einer ausbalancierten Proteinmenge von DYRK1A, bei der eine Veränderung nach oben oder nach unten ähnliche Auswirkungen hat. Eine Überexpression von DYRK1A wird auch mit einer Phosphorylierung von p53 an Serin 15 und damit mit einer Aktivierung in Verbindung gebracht. Dies führt möglicherweise zu einem Zellzyklusarrest (Park et al., 2010). Ein Ungleichgewicht in der Proteinmenge von DYRK1A schlägt sich in einer starken Veränderung des Levels des „Neuron-restrictive silencing factor/Repressor element 1 silencing transcription factor“ (NRSE/REST) nieder (Canzonetta et al., 2008). DYRK1A scheint außerdem eine Komponente bei der durch den epithelialen Wachstumsfaktor (EGF) ausgelösten Differenzierung adulter neuronaler Stammzellen zu sein (Ferron et al., 2010). DYRK1B spielt eine wichtige Rolle bei der Myogenese. Es fördert sowohl die Differenzierung einzelner Myoblasten, als auch das Überleben von differenzierenden Muskelfasern (Deng et al., 2005). Dies scheint durch Phosphorylierungen mehrerer Proteine zustande zu kommen. p27 wird durch eine Phosphorylierung stabilisiert, wohingegen CYCLIND1 destabilisiert wird (Deng et al., 2004; Zou et al., 2004). Die Phosphorylierungen der Histondeacetylasen 5 und 9 (HDAC5 und HDAC9) führen zu einer Derepression von MEF2 und außerdem zu einer Translokation von HDAC5 aus dem Nukleus und somit zu einer Verminderung der Histondeacetylase Aktivität im Kern (Deng et al., 2005). Beide Mitglieder der DYRK1-Gruppe werden weiterhin bei der Differenzierung von Osteoklasten induziert. Die Inhibition von NFAT durch DYRK1A wirkt hier als negatives Feedback, da DYRK1A sowohl NFATs („Nuclear factor of activated T-cells“) inhibieren kann (Arron et al., 2006), als auch durch NFAT2-Aktivität akkumuliert (Lee et al., 2009). DYRK2 scheint für den Übergang von der G₂- zur M-Phase wichtig zu sein (Maddika und Chen, 2009). DYRK3 reguliert die späte Erythropoese und sorgt für das Überleben von hämatopoetischen Vorläuferzellen (Li et al., 2002). Ein Fehlen von DYRK3 resultiert in einer Veränderung der Anzahl an reifen Retikulozyten nach der Induktion der Erythropoese durch eine hämolytische Anämie

(Bogacheva et al., 2008). DYRK3 zeigt eine hohe Expression in erythroiden Vorläuferzellen und wird bei der GATA1 („GATA-binding factor 1“-induzierten erythroiden Differenzierung inhibiert (Lord et al., 2000; Zhang et al., 2005). Die fördernde Rolle von DYRK3 in der Differenzierung könnte durch die Kinase-unabhängige Aktivierung des „cAMP response element binding protein“ (CREB) und der Inhibition von NFAT Transkriptionsfaktoren erklärt werden (Bogacheva et al., 2008; Li et al., 2002).

Ein weiteres Feld, aus denen viele der Ziele von DYRKs kommen, ist die Regulation der Transkription. NFATs werden beispielsweise direkt durch einige Mitglieder der DYRK-Familie phosphoryliert. Dies führt zu einer Translokation der Proteine aus dem Kern und somit zu einer Inaktivierung der NFAT-Aktivität (Arron et al., 2006; Bogacheva et al., 2008; Gwack et al., 2006; Kuhn et al., 2009; Lee et al., 2009). DYRK1A ist Bestandteil des „Switch/Sucrose non-fermenting“ (SWI/SNF)-Komplexes (Lepagnol-Bestel et al., 2009) und arbeitet mit der SNF2-ähnlichen ATPase „Androgen receptor-interacting protein 4“ (ARIP4) zusammen (Sitz et al., 2004). Wie bereits weiter oben beschrieben wird auch der HH-Signalweg durch DYRKs reguliert. DYRK1A wirkt sich stimulierend auf GLI aus, wohingegen DYRK1B und DYRK2 inhibierend wirken (Lauth et al., 2010; Mao et al., 2002; Varjosalo et al., 2008).

2.2.3 Mit DYRKs assoziierte Krankheiten

Das Familienmitglied, das am häufigsten mit Krankheiten in Verbindung gebracht wird, ist DYRK1A (Aranda et al., 2011). Ein möglicher Grund hierfür ist die starke Abhängigkeit seiner Wirkung von einer ausbalancierten Gendosis. Beim Down-Syndrom ist diese durch die Trisomie des Chromosoms 21 um den Faktor 1,5 erhöht. Diese Erhöhung schlägt sich in einer Überexpression sowohl des Transkriptes, als auch des Proteins nieder. Einige der neuropathologischen Auswirkungen dieser Krankheit lassen sich direkt auf die erhöhten Level der Kinase zurückführen (Park et al., 2009). Mutationen im *DYRK1A*-Gen resultieren ebenfalls in verschiedenen klinischen Phänotypen. So führen verkürzte DYRK1A Proteine zu Mikrocephalie, intrauteriner Wachstumsretardierung und Entwicklungsdefiziten (Moller et al., 2008). Weitere pathologische Vorgänge, bei denen DYRK1A eventuell beteiligt ist, sind Neurodegeneration, Herzhypertrophie und Deregulationen in der Knochenhomöostase (Laguna et al., 2008; Lee et al., 2009; Raaf et al., 2010; Ryoo et al., 2007). Die Kinasen DYRK1B und DYRK2 scheinen eine Rolle bei der Tumorentwicklung zu spielen. Erhöhte Level an DYRK1B wurden in verschiedenen Tumoren gefunden und es gibt einige Hinweise darauf, dass dadurch das Tumorstadium gefördert wird (Friedman, 2007). Dazu zählen Dickdarm- und Lungenkrebs, PDACs und Rhabdomyosarkome. Im Gegensatz dazu zeigen einige Tumore niedrige DYRK2-Level und eine gesteigerte Expression von DYRK2 in gastralen Karzinomen, Lungenkrebs und PDACs zu einer

besseren Prognose für den Patienten (Yamashita et al., 2009a; Yamashita et al., 2009b). Eine mögliche Erklärung dafür liefert die proapoptotische Funktion in Verbindung mit p53 (Taira et al., 2007) und der negative Einfluss auf die Proliferation durch den Abbau von TERT (Jung et al., 2013). Auch die Stabilität von JUN („Jun proto-oncogene“) und MYC („v-Myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog“) wird durch DYRK2 reguliert. Die Degradation dieser beiden Proteine ist ein entscheidender Schritt bei der Regulation des Übergangs von der G1- zur S-Phase. Ihre Phosphorylierung durch DYRK2 wird für eine weitere Phosphorylierung durch GSK3 β benötigt. Dadurch werden JUN und MYC letztendlich für eine Ubiquitinierung und den darauffolgenden proteosomalen Abbau markiert. Ein „Knockdown“ von DYRK2 in humanen Krebszelllinien resultiert in einer verkürzten G1-Phase und einer beschleunigten Zellproliferation (Taira et al., 2012). Weitere Beteiligungen von DYRKs in Krankheiten sind aufgrund der Funktion der Kinasen in Entwicklung und Zellhomöostase sehr wahrscheinlich (Aranda et al., 2011).

2.2.4 Regulation des AKTIN-Zytoskeletts durch DYRK1A

Eine weitere Funktion von DYRK1A ist die Regulation des Zytoskeletts. So wurde in einem RNAi-„Screen“ gezeigt, dass die Menge an DYRK1A das AKTIN-Zytoskelett in Zellen, die vom zentralen Nervensystem abstammen, beeinflusst (Liu et al., 2009). In Down-Syndrom-Patienten, die eine Überexpression von DYRK1A zeigen, wurde ebenfalls eine DYRK1A-abhängige Modifikation des AKTIN-Zytoskeletts gezeigt (Dowjat et al., 2012). In kultivierten kortikalen Neuronen aus Säugetieren war eine Überexpression von DYRK1A ausreichend, um die Entstehung von Synapsen sowie das Wachstum von Neuriten zu reduzieren, wie es auch in Down-Syndrom-Patienten zu beobachten ist. Diesem Mechanismus liegen dynamische Änderungen des Zytoskeletts zu Grunde (Martinez de Lagran et al., 2012). Der depolymerisierende Einfluss von DYRK1A auf das AKTIN-Zytoskelett lässt sich auf eine direkte Phosphorylierung von N-WASP („Neuronal Wiskott-Aldrich syndrome protein“) durch die Kinase zurückführen. Diese Phosphorylierung führt zu einer intramolekularen Interaktion der GTPase-Bindedomäne (GBD) von N-WASP mit dessen VCA (Verprolin, Cofilin, „Acidic“)-Domäne. Letztendlich wird so die durch den ARP2/3 („Actin-related protein 2/3“)-Komplex vermittelte Polymersation des AKTIN-Zytoskeletts inhibiert (Park et al., 2012). Ergebnisse der eigenen Gruppe zeigen eine *in vitro* Phosphorylierung des AKTIN-bindenden LIM Proteins 1 (ABLIM1) und liefern somit einen weiteren Mechanismus der Regulation des AKTIN-Zytoskeletts durch DYRK1A (P. Holz). Auch konnte in dieser Arbeit ein Zusammenhang zwischen ABLIM1 und dem HH-Signalweg gezeigt werden und so die Effekte von DYRK1A auf den HH-Signalweg weiter charakterisiert werden.

2.3 AKTIN-bindende LIM-Proteine

Proteine, die zu den LIM-Proteinen gezählt werden, sind in verschiedenste biologische Prozesse verwickelt. Dazu zählen unter anderem die Embryonalentwicklungen, Differenzierung und Kontrolle des Zellwachstums (Schmeichel und Beckerle, 1994). Auch ein Mitwirken bei der Entstehung von Krebs wurde bereits gezeigt (Grutz et al., 1998; Sum et al., 2002; Wei et al., 2003).

Namensgebender Bestandteil dieser Proteine ist die LIM-Domäne, die zuerst in den Proteinen LIN-11, ISLET-1 (ISL-1) und MEC-3 entdeckt wurde. Die LIM-Konsensussequenz besteht aus 50-60 Aminosäuren ($C(X)_2C(X)_{16-32}H(X)_2C(X)_2C(X)_2C(X)_{16-21}C(X)_2(C/H/D)$). Dieses Doppelzinkfingermotiv vermittelt vielfältige Protein-Protein-Interaktionen (Schmeichel und Beckerle, 1994). Allerdings ist bis heute kein einheitliches Motiv für die Bindung an LIM-Domänen beschrieben worden (Dawid et al., 1998). Einige Proteine, die lediglich aus LIM-Domänen bestehen, sogenannte „LIM domain only“ (LMO) Proteine, spielen eine wichtige Rolle bei der akuten Leukämie (Grutz et al., 1998). LMO4 wirkt bei der Entstehung von Brustkrebs mit (Sum et al., 2002) und FHL2 („Four and a half LIM domains 2“), ein Protein das die Regulation von MKL1 („Megakaryoblastic leukemia 1“, siehe 2.4.1) beeinflusst (Hinson et al., 2008; Philippar et al., 2004; Wixler et al., 2007), kann β -CATENIN induzieren (Wei et al., 2003).

1997 wurde ein neuartiges Protein beschrieben, das die Eigenschaften von LIM-Proteinen mit der Fähigkeit AKTIN-Filamente zu binden kombiniert. Dieses Protein wurde AKTIN-bindendes LIM Protein (ABLIM) genannt und später in ABLIM1 umbenannt. Die Bindung an das AKTIN-Zytoskelett wird von einer Domäne vermittelt, die eine große Homologie zu Dematin aufweist. Dieses Protein könnte mit seinen AKTIN-bindenden Eigenschaften die Zellmorphologie steuern und so zur Etablierung und Aufrechterhaltung zellulärer Strukturen führen. Durch seine zusätzliche Fähigkeit, andere Proteine über die LIM-Domäne zu binden, könnte es als Vermittler zwischen dem Zytoskelett und anderen zellulären Signalen dienen und so Prozesse wie Differenzierung und ähnliches steuern. ABLIM1 ist in einer Vielzahl von Gewebetypen und Zellarten exprimiert und vor allem in AKTIN-reichen Regionen lokalisiert (Roof et al., 1997). Weiterhin ist ABLIM1 ein mögliches Tumorsuppressorgen. Diese Annahme wird durch seine Lokalisation im Genom unterstützt. Das *ABLIM1*-Gen liegt in einer Region, die häufig Heterozygotie aufweist und vor allem in Krebszellen oft deletiert ist (Kim et al., 1997). Das ABLIM1-Protein unterliegt einer Vielzahl an Phosphorylierungsereignissen. Vor allem in der Retina sind einige dieser posttranslationalen Modifikationen in Abhängigkeit von Licht beschrieben. Insgesamt sind 36 Phosphorylierungsstellen für ABLIM1 vorhergesagt (Roof et al., 1997).

Bis heute sind insgesamt drei ABLIM-Familienmitglieder bekannt. ABLIM2 wurde 2005 beschrieben und hat viele vergleichbare strukturelle Eigenschaften wie ABLIM1 (Klimov et al., 2005). Die mRNA von ABLIM3 wurde bei der Untersuchung von unterschiedlich regulierten Genen in Hepatoblastomen entdeckt. Gemeinsam sind diesen Proteinen die vier N-terminalen LIM-Domänen und die C-terminale VHD („Villin head piece domain“) (Krupp et al., 2006). Die VHD von ABLIM1 ist zu 50 % identisch mit der Zytoskelettdomäne von Demantin und vermittelt dort die Regulation von zellulären Prozessen über die Modulation des AKTIN-Zytoskeletts (Rana et al., 1993; Roof et al., 1997). Daher wurde diese Domäne zuerst als F-AKTIN-Bindedomäne beschrieben. Allerdings binden nicht alle VHDs AKTIN (Krupp et al., 2006). Für ABLIM1 und ABLIM2 wurde eine solche Interaktion bereits beschrieben und aufgrund der strukturellen Verwandtschaft von ABLIM3 zu diesen beiden, wurde eine solche Bindeeigenschaft auch für ABLIM3 angenommen und 2010 bestätigt (Matsuda et al., 2010). ABLIM2 und ABLIM3 zeigen dabei einen höheren Verwandtschaftsgrad untereinander als zu ABLIM1 (Klimov et al., 2005; Krupp et al., 2006; Matsuda et al., 2010; Roof et al., 1997).

Wie bereits erwähnt, bieten diese Proteine das Potential, Prozesse im AKTIN-Zytoskelett mit anderen Signalkaskaden in Verbindung zu bringen. Es gibt Berichte darüber, dass ABLIM-Proteine SRF („Serum response factor“)-abhängige Transkription beeinflussen können (Barrientos et al., 2007). Verbindungen zwischen dem SRF-Signalweg und der HH-Signalkaskade wurden bereits gezeigt (Arsenian et al., 1998; Zheng et al., 2013). In dieser Arbeit wurde daher ein möglicher nicht-kanonischer Einfluss von DYRK1A über ABLIM-Proteine und SRF untersucht.

2.4 SRF-abhängige Transkription

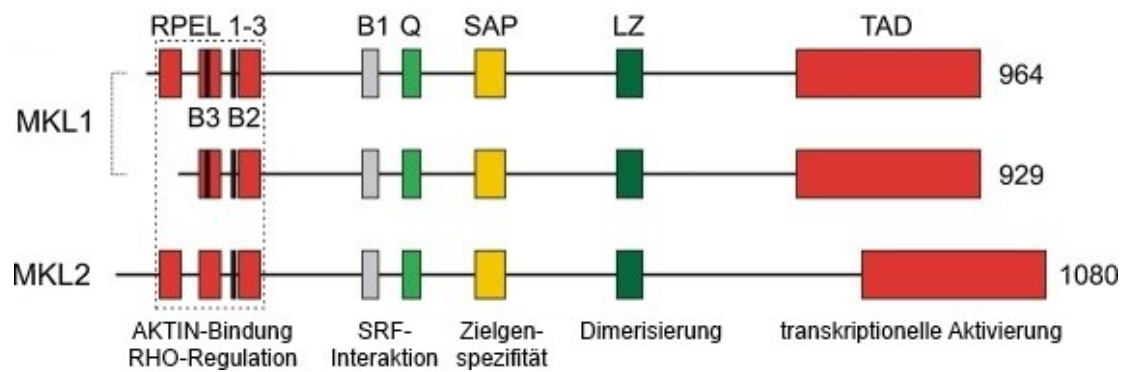
Der Transkriptionsfaktor SRF hat eine essentielle Rolle in annähernd jedem Organsystem (Miano, 2010). Eine Deletion des *Srf*-Gens ist nicht mit dem Leben vereinbar (Arsenian et al., 1998). Die Konsensussequenz an die SRF im Genom bindet lautet 5'-CC(A/T)₆GG-3' und ist besser bekannt als CArG-Box oder „Serum response element“ (SRE) (Treisman, 1986). Das menschliche Genom enthält mehr als 8000 dieser CArG-Boxen. Man spricht daher auch vom CArGom, das tausende von Protein-kodierende Sequenzen beinhaltet (Benson et al., 2011). Viele Gene, die zum Feld des AKTIN-Zytoskeletts zählen, enthalten solche SREs. Einen großen Anteil im CArGom nehmen die sogenannten „Immediate early genes“ (IEGs) ein. SRF benötigt für seine transkriptionelle Aktivität stets einen Kofaktor. Dies kann ein Protein der „Ternary complex factor“ (TCF)-Familie sein (Shaw et al., 1989; Small, 2012). Die andere Familie, die als Kofaktor für SRF dienen kann, sind Myocardin (MYOCD) und dessen verwandte Proteine „Megakaryoblastic leukemia 1“ (MKL1) und MKL2 (Cen et al., 2003; Miralles et al., 2003; Selvaraj und Prywes, 2003; Wang et al., 2001; Wang et al., 2002). Letztere fördern neben den IEGs (Lee

et al., 2010) vor allem die Expression von kontraktile oder muskelspezifischen Proteinen und sind ein Schlüsselmediator für die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten (Chang et al., 2001; Miano, 2003; Small, 2012; Wang et al., 2001).

2.4.1 Die Kofaktoren der MKL-Familie

Die Familie der MKLs beinhaltet die zwei Mitglieder MKL1 (Sasazuki et al., 2002) und MKL2 (Mercher et al., 2001; Selvaraj und Prywes, 2003; Wang et al., 2002). Diese beiden Proteine sind in 42 % der Aminosäuren identisch (Wang et al., 2002). Es gibt allerdings Domänen mit einer wesentlich höheren Homologie. N-Terminal haben diese Proteine zwei bis drei RPEL-Motive (Arginin-Prolin-X-X-X-Glutamat-Leucin), die eine Interaktion mit G-AKTIN vermitteln (Miralles et al., 2003). Die Bindung von fünf G-AKTIN Monomeren verhindert die Bindung von Importinen an die NLS von MKLs und so ihre nukleäre Translokation. Bei weniger Bindung von G-AKTIN an MKL wird zusätzlich der XPO1 (Exportin 1) gesteuerte nukleäre Export vermindert (Mouilleron et al., 2011). Bei zunehmender Polymerisation von F-AKTIN im Zytoplasma vermindert sich G-AKTIN und MKL transloziert vermehrt in den Nukleus. Allerdings bleiben die SRF Zielgene weitestgehend still, bis auch der nukleäre G-AKTIN-Pool ausreichend vermindert wurde (Cen et al., 2003; Hinson et al., 2007). Auch die „Spacer“ Region zwischen den RPEL-Domänen ist wichtig für die Bindung von AKTIN und vor allem für den nukleären Export (Mouilleron et al., 2011). Mehrere basische Boxen (B1, B2 und B3) sind für die Akkumulation im Nukleus von Bedeutung und die B1- zusammen mit einer glutaminreichen Domäne (Q) sind für die Interaktion mit SRF verantwortlich (Cen et al., 2003; Miralles et al., 2003). Ebenfalls erhöhte Homologie findet sich in der SAP-Domäne, benannt nach den Proteinen SAF-A („Scaffold attachment factor A“), Acinus und PIAS („Protein inhibitor of activated STAT“) in denen sie ebenfalls enthalten ist (Aravind und Koonin, 2000). Dieser Domäne wird eine Bedeutung für die Erkennung von Zielgenen nachgesagt (Asparuhova et al., 2011; Kalita et al., 2012). Zusätzlich beinhaltet das Protein eine leucinzipper-ähnliche Domäne für die Homo- bzw. Heterodimerisierung und die Transaktivierungsdomäne. Letztere weist nur eine geringe Sequenzhomologie zwischen den beiden Familienmitgliedern auf (Miralles et al., 2003; Selvaraj und Prywes, 2003). Die Domänenstruktur der beiden Proteine ist in Abbildung 2.6 dargestellt.

Durch die Bindung von G-AKTIN-Monomeren an MKL können Vorgänge im AKTIN-Zytoskelett mit SRF-abhängiger Genexpression in Verbindung gebracht werden (Cen et al., 2003; Miralles et al., 2003; Selvaraj und Prywes, 2004). Da dadurch vor allem kontraktile Elemente des Zytoskeletts reguliert werden, kann so ein Phänotyp ähnlich von Zellen der glatten Muskulatur (SMC) auch in Nichtmuskelzellen induziert werden (Olson und Nordheim, 2010; Posern und Treisman, 2006).



modifiziert nach (Kalita et al., 2012)

Abbildung 2.6: Proteinstruktur von murinem MKL1 und MKL2. Die Zahlen an der rechten Seite zeigen die Länge in Aminosäuren an. In Maus und Mensch wurden zwei Isoformen von MKL1 gefunden (Cen et al., 2003; Miralles et al., 2003). Die farbigen Balken zeigen die konservierten Regionen der beiden Proteine. RPEL 1-3: RPEL-Motive benannt nach der Aminosäuresequenz Arginin-Prolin-X-X-X-Glutamat-Leucin; B1, B2 und B3: basische Boxen; Q: Glutaminreiche Domäne; SAP: Homologiedomäne benannt nach den Proteinen SAF-A, Acinus, PIAS; LZ: Leucinzipper-ähnliche Domäne; TAD: Transaktivierungsdomäne (Kalita et al., 2012).

2.4.2 Regulation der AKTIN-MKL-SRF-Achse

Für die AKTIN-MKL-SRF-Achse relevante Veränderungen im AKTIN-Zytoskelett werden vor allem durch GTPasen der RHO (Ras-homologen)-Familie, wie RHOA, RAC1 und CDC42 („Cell division cycle 42“) gesteuert (Liu et al., 2003; Mack et al., 2001; Olson und Nordheim, 2010). Diese Mediatoren der MKL/SRF-Aktivität aktivieren ROCK („RHO associated protein kinase“), was wiederum zu einer Aktivierung der Proteine Profilin und mDiaphanous führt und letztendlich in der Polymerisation von G-AKTIN in F-AKTIN endet (Sotiropoulos et al., 1999). Die daraus folgende Verminderung des G-AKTIN-Pools führt zu dessen verminderter Bindung an der RPEL-Domänen von MKL und zu dessen Translokation in den Kern (Mouilleron et al., 2011). Die Akkumulation von MKL im Kern und die Interaktion mit SRF führt dann zu einer Aktivierung der SRF-Zielgene (Vartiainen et al., 2007). Im Kern bietet nukleäres G-AKTIN eine weitere Möglichkeit zur Regulation von MKL und auch SRF selbst wird zusätzlich durch AKTIN reguliert (Baarlink et al., 2013; Liu et al., 2003). Die Polymerisation von F-AKTIN wird unterstützt durch die Inhibition der Cofilin-vermittelten Depolymerisation durch den RHO-Signalweg und der Aktivierung der LIM-Kinasen (Sotiropoulos et al., 1999). Die Aktivierung von MKL kann durch Liganden-abhängige Oberflächenrezeptoren, biomechanische Spannung, wie etwa ein Dehnen der Zellen, aber auch die Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte ausgelöst werden (Busche et al., 2008; Chan et al., 2010; Kuwahara et al., 2010; Wang et al., 2003; Zhao et al., 2007a). Der Faktor STARS („Striated muscle activator of RHO signaling“) kann ebenfalls G-AKTIN binden und so von MKL sequestrieren, was zu einer Anreicherung von MKL im Kern führt (Kuwahara et al., 2005; Kuwahara et al., 2007). Bei allen diesen Vorgängen sind fast immer RHO-GTPasen beteiligt, daher ist eine Regulation von MKL unabhängig vom AKTIN-Zytoskelett schwer zu untersuchen (Small, 2012). Phosphorylierung und Sumoylierung von MKL wurde bereits gezeigt (Muehlich et

al., 2008; Nakagawa und Kuzumaki, 2005). In kortikalen Neuronen wurde beobachtet, dass es durch „Brain-derived neurotrophic factor“ (BDNF) induziertes ERK1/2 („Extracellular-signal regulated kinase 1/2“) zu einer Phosphorylierung von MKL1 und einer darauffolgenden Aktivierung der SRF-getriebenen Transkription von Zielgenen kommt (Kalita et al., 2006). Allerdings wurde auch gezeigt, dass eine Serum-induzierte Phosphorylierung von MKL1 zu einem Export aus dem Nukleus führt. Diese Phosphorylierung ließ sich durch den MAP2K1 („Mitogen-activated protein kinase kinase 1“)-Inhibitor UO126 blockieren, was ebenfalls auf eine Phosphorylierung durch ERK1/2 hindeutet. Für die Forscher sind unter anderem verschiedene Phosphorylierungsstellen oder zelltypspezifische Effekte eine mögliche Erklärung für diese widersprüchlichen Resultate (Muehlich et al., 2008). Auch über die Regulation der Proteinstabilität ist eine Steuerung denkbar. Einige Proteasominhibitoren führen zu einer Akkumulation von MKL (Elberg et al., 2008; Hinson et al., 2008). Das Protein FHL2 (siehe 2.3) führt zu einer Akkumulation von MKL1, was möglicherweise über die Inhibition der E3-Ubiquitin-Ligase MURF3 geschieht (Hinson et al., 2008). Weiterhin kompetitiert es mit MKL um die Bindung an SRF, was zu einer Inaktivierung der SRF-getriebenen Transkription führt. FHL2 ist ein Zielgen von SRF und führt damit zu einem negativen Feedback (Philippart et al., 2004). Ein weiteres Protein, das die transkriptionelle Aktivität des MKL/SRF-Komplexes negativ reguliert, ist das Protein der Polycombgruppe Yin Yang-1 (YY1). Positive Regulatoren sind NKX2-5 („NK2 homeobox 5“) und GATA4 (Chen und Schwartz, 1997; Ellis et al., 2002; Martin et al., 1997; Miralles und Visa, 2006; Sepulveda et al., 2002).

2.4.3 Weitere Interaktionspartner von MKL

Die transkriptionellen Kofaktoren der MKL-Familie können neben SRF auch mit anderen Proteinen interagieren. So wurde gezeigt, dass Myocardin, MKL1 und MKL2 mit der Lysin-spezifische Demethylase 3A (KDM3A) interagieren können. Über die Demethylierung von Histon 3 an Lysin 9 reguliert dieses Protein zusammen mit MKL1 die Differenzierung von glatten Muskelzellen (Lockman et al., 2007). BRG1 („Brahma related gene 1“), eine Komponente des ATP-abhängigen Chromatinremodelling Komplexes SWI/SNF, kann ebenfalls direkt an MKL1 binden und es wurde gezeigt, dass dieses Protein wichtig für die MKL1/SRF-vermittelte Expression von Proteinen ist, die spezifisch für glatte Muskelzellen sind, nicht aber für die AKTIN/RHO-abhängigen frühen Antwortgene (Zhang et al., 2007). Auch einige Proteine der SMAD-Familie binden direkt an Myocardin, MKL1 und MKL2 (Callis et al., 2005; Iwasaki et al., 2008; Morita et al., 2007; Qiu et al., 2005).

2.4.4 Funktionen von MKL

Die Aktivierung von MKL in Fibroblasten führt zur Differenzierung in Myofibroblasten, einem migrierenden und kontraktile Phänotypen ähnlich dem von SMCs. Dies wird durch die Expression muskelspezifischer Gene, wie etwa „Smooth-muscle actin“ (SMA/ACTA2) oder Taglin (SM22) verursacht (Desmouliere et al., 1993; Mayer und Leinwand, 1997). Eine anhaltende Aktivierung der Kofaktoren kann zu Organfibrose und exzessiver Vernarbung führen. Eine wichtige Rolle spielen Myofibroblasten bei der Remodellierung von Organen und auch in Tumoren (Desmouliere et al., 2003). TGF β spielt als Mediator des Myofibroblastenphänotyps und damit auch bei der Fibrose eine wichtige Rolle, sowohl während der Embryonalentwicklung als auch krankheitsbedingt, wie etwa bei der Zellmotilität oder bei epithelial-mesenchymaler-Transition (EMT) (Bujak und Frangogiannis, 2007; Hao et al., 1999). TGF β aktiviert SMAD3, welches im Kern mit MKL interagiert und Zielgene mit „SMAD response element“ aktivieren kann. Die Interaktion von SMAD und MKL kann das Heterodimer MKL/SRF synergistisch unterstützen, wie etwa bei der Expression von SM22, aber SMAD3 kann auch mit SRF und MKL konkurrieren und damit SRF-Zielgenexpression inhibieren (Masszi et al., 2010; Morita et al., 2007).

Für die Wundheilung sind motile und kontraktile Myofibroblasten von Bedeutung. Aktivierung von MKL kann Fibroblasten und auch Epithelzellen in solche Zellen transformieren (Liu et al., 2005b). Viele der Vorgänge in diesen Myofibroblasten fördern EMT, wie etwa der Verlust von E-Cadherin (ECAD). Biomechanische Kräfte, denen die Zellen beim EMT oder der Zellmigration ausgesetzt sind, führen wiederum zu einer Translokation von MKL in den Kern und damit zu einem Feedforward-Effekt (Kuwahara et al., 2010; McGee et al., 2011; Small, 2012). Ein längeres Andauern dieses Prozesses kann zu Narbenbildung und zu pathologischer Fibrose führen. Nach erfolgreicher Wundheilung müssen daher die Myofibroblasten wieder entfernt werden. Dies könnte über den Abbau von Myofibroblasten oder auch durch eine Depolymerisation von F-AKTIN und der damit verbundenen Zurückentwicklung von Myofibroblasten geschehen (Small, 2012).

Im Tiermodell wurde eine generelle Funktion von MKLs bei der Zellmotilität und –kontraktilität bestätigt (Han et al., 2004; Somogyi und Rorth, 2004) und für die beiden Familienmitglieder MKL1 und MKL2 wurden sowohl redundante als auch spezialisierte Funktionen gezeigt. In verschiedenen Geweben haben beide unterschiedliche Funktionen und ein MKL2 „Knockout“ ist embryonal letal (Li et al., 2005). Allerdings ist nur eines der beiden für eine normale Entwicklung des Gehirns von Nöten (Mokalled et al., 2010). Tiere mit einem MKL1 „Knockout“ sind lebensfähig und fruchtbar. Allerdings können solche Weibchen ihre Jungen nicht stillen, da die

Differenzierung von Epithelzellen zu kontraktile Zellen in der Milchdrüse gestört ist (Li et al., 2006; Sun et al., 2006).

2.5 Ziele der Arbeit

Neben seiner immensen Wichtigkeit für Entwicklungen während des Embryonalstadiums kann der HH-Signalweg bei ektopischer Reaktivierung im adulten Organismus die Entstehung von Tumoren fördern. Dies zeigt sich deutlich durch die gesteigerte Aktivität dieses Signalwegs in etwa 30 % aller Tumorerkrankungen. HH zählt außerdem zu den zwölf Grundelementen, die bei einem globalen genomweiten „Screen“ humaner PDAC-Proben gefunden wurden (Jones et al., 2008). Neben der kanonischen Kaskade, die über einen der HH-Liganden gestartet wird, spielt auch die Regulation über nicht-kanonische Einflüsse, wie etwa Kinasen der DYRK-Familie, eine Rolle bei der HH-vermittelten Tumorentstehung. Die Familienmitglieder DYRK1B und DYRK2 wirken eher als Gegenspieler auf die Signalwegsaktivität (Lauth et al., 2010; Varjosalo et al., 2008). DYRK1A hingegen fördert die Aktivität des terminalen Transkriptionsfaktors GLI1. Dies benötigt den N-terminalen Teil dieses Proteins und geschieht durch eine direkte Phosphorylierung dieses Proteins durch DYRK1A. So phosphoryliertes GLI1 ändert seine subzelluläre Verteilung in Richtung Nukleus und führt dort zu Expression von HH-Zielgenen (Mao et al., 2002; Shimokawa et al., 2008). Proteinkinasen bieten ideale Zielstrukturen für die Entwicklung von hochpotenten Pharmazeutika.

Ziel dieser Arbeit war es, die Stimulation der HH-Signalwegsaktivität durch DYRK1A weiter zu charakterisieren. Dafür sollten die Phosphorylierungsstellen von DYRK1A in GLI1 ermittelt werden, die für die Aktivierung und die vermehrte Lokalisation im Zellkern verantwortlich sind. Auch die Bedeutung einer solchen posttranslationalen Modifikation für die Interaktion von GLI1 mit einem der negativen Hauptregulatoren des HH-Signalwegs SUFU sollte untersucht werden. Letztendlich sollte die Bedeutung von DYRK1A für die HH-Aktivität in Tumorzelllinien bestimmt werden und FGF-2 als ein möglicher nicht-kanonischer Einfluss für DYRK1A- und HH-Aktivität untersucht werden. Auch der Einfluss, der von der Gruppe entdeckten Phosphorylierung des Proteins ABLIM1 durch DYRK1A für den HH-Signalweg, war ein Ziel dieser Arbeit.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Name	Firma
Acura® electro 200 µL 926.0200E	Socorex Isba, Ecublens, Schweiz
Autoklav FVA/2	Fedegari Autoclavi Spa, Albuzzano, Italien
Autoklav FVS/2	Fedegari Autoclavi Spa, Albuzzano, Italien
Blockthermostat QBD2	Grant Instruments, Cambridgeshire, UK
Brutschrank BBD6120 (nicht begasbar)	Heraeus, Hanau
Drehschieber-Vakuumpumpe Typ RZ8	Vacuubrand GmbH, Wertheim
Einfrierbox Mr. Frosty Freezing Container	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Eismaschine	Ziegra, Isernhagen
Elektroporator Amaxa®Nucleofector®II	Lonza, Basel, Schweiz
EPSON Stylus BX535WD	Epson Europe Electronics GmbH, München
Feinanalysenwaage ABT220-4M	KERN, Balingen
Feinanalysenwaage Research R200D	Sartorius, Göttingen
Filmentwickler Kodak X-Omat 2000 Processor	Kodak, Rochester USA
Finnpipette®	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Fluoreszenzmikroskop DMI 3000B mit Farbkamera DFC300 FX	Leica, Wetzlar
Fluoreszenzmikroskop DMR mit QuantiFire XI Kamera (Intas Science Imaging Instruments, Göttingen)	Leica, Wetzlar
Geldokumentationsanlage und Software mit Videoprinter Modell P93DW	Intas Science Imaging Instruments, Göttingen Mitsubishi, Otemachi, Japan
Heißluftsterilisator T 5050 E	Heraeus, Hanau
Hellfeld-Lichtmikroskop FLUOVERT	Leitz, Wetzlar

Hellfeld-Lichtmikroskop LABOVERT FS	Leitz, Wetzlar
HERAcell®240i CO₂ Inkubator	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Inkubations- und Inaktivierungsbad 1001	GFL, Burgwedel
Kühl- und Gefrierschränke 4 °C und -20 °C	diverse Hersteller
Kühlzentrifuge Allegra® X-15R, Rotor SX4750A	Beckman Coulter, Brea, USA
Kühlzentrifuge J2-21 M/E, Rotoren JS-13.1, JA-20	Beckmann, München
Kühlzentrifuge Mikro 200R	Hettich AG, Bäch, Schweiz
Kühlzentrifuge Multifuge 3L-R für PP- Röhrchen	Heraeus, Hanau
Magnetrührer CIMAREC, beheizbar	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Magnetrührer IKAMAG REO, nicht beheizbar	IKA Labortechnik, Staufen
Magnetrührer IKAMAG RET, beheizbar	IKA Labortechnik, Staufen
Magnetrührer MR2000	Heidolph, Schwabach
Mikrowelle Energia NN-E245WB EPG	Panasonic, Osaka, Japan
Mini Trans Blot Cell tank blot system	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Mini-PROTEAN® TetraCell electrophoresis system	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Mini-PROTEAN®Tetra Cell System (SDS-Gele & Western-Blot)	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Mini-Sub®Cell GT System (Agarose Gele)	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
MX3000P/3005P QPCR System	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
NanoDrop® ND-1000	PeqLab, Erlangen
Netzgerät PowerPac™ Basic	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Netzgerät PowerPac™ HC	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Netzgerät PP200-1D	MWG-Biotech, Ebersberg
Orbitalschüttler KS 501 digital	IKA Labortechnik, Staufen
OrionL Microplate Luminometer	Berthold Detection Systems, Pforzheim

PCR Robocycler Gradient 96	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Peltier Thermal Cycler PTC-200	MJ Research, Quebec, Kanada
pH-Meter inoLab pH720	WTW, Weilheim
Photometer SpectraMax 340	MWG-Biotech, Ebersberg
Pipetboy Acu Integra	Integra Biosciences, Zürich, Schweiz
Pipetman „classic“ (P2, P10, P20, P100, P200, P1000)	Gilson, Middleton, USA
pipetus® standard	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Power Supply Model 100/200	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Präzisionswaage Modell S-4002	Denver Instrument, Göttingen
Reinstwassersystem Milli-Q Water System	Millipore, Eschborn
Reinstwassersystem Ultra Clear UVplus 2004,SG	SG-Wasseraufbereitung & Regenerierstation GmbH, Barsbüttel
Röntgenfilmkassette	Hersteller unbekannt
Röntgenfilm-Prozessor SRX-101 A	Konica Minolta, Marunouchi, Japan
Rotator für 1,5 + 2 ml Reaktionsgefäße	Heidolph, Schwabach
Rotator Revolver 5600	Labnet, Woodbridge, USA
Schüttelinkubatoren AJ112 und AJ120	Infors AG, Bottmingen, Schweiz
Schüttler ST5 CAT	CAT M. Zipperer GmbH, Staufen
Schweißgerät Polystar 401M	Polystar, Hamburg
Sterilbank LaminAir HA2448	Heraeus, Hanau
Stickstoff-Lagersystem Chronos 350 Biosafe	Messer-Griesheim, Düsseldorf
Stickstoff-Tank APOLLO Biosafe	Messer-Griesheim, Düsseldorf
Tiefkühlschränke -80 °C	diverse Hersteller
Tischzentrifuge Galaxy MiniStar	VWR International GmbH, Darmstadt
Tischzentrifuge Microfuge® 16 Centrifuge	Beckman Coulter, Krefeld
Tischzentrifuge Pico™17	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Tischzentrifuge Typ Biofuge Pico	Heraeus, Hanau
Ultrazentrifuge Optima™ TL-100 mit Rotor TLA-45	Beckman Coulter, Krefeld
Universalwaage U5000D	Sartorius, Göttingen

UV-Transilluminator 2040EV	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
Vakuumpumpe LH101	Leybold AG, Hanau
Vakuumpumpe PM20405-86	VWR International GmbH, Darmstadt
Vortex 7-2020	neoLab, Heidelberg
Vortex REAX 2000	Heidolph, Schwabach
Vortex VF2	Janke und Kunkel IKA-Labortechnik, Staufen
Wasserbad Thermomix ME	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Wide Mini-Sub®Cell GT System (Agarose Gele)	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Zentrifuge Avanti® J-26 XP mit Rotor JA-25.50	Beckman Coulter, Brea, USA

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Name	Firma
96 well PP-Microplatte, steril, weiss, transparenter Boden für Luziferase-Assay	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
96 well PP-Microplatte, weiss, flacher Boden für Luziferase-Assay	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Adhäsive PCR-Verschlussfolie	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Biosphere® Filterspitze (0,5-20 µl, 2-20 µl, 2-200 µl, 100-1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Blottingpapiere, 0,4 mm dick, 460 mm × 570 mm	Hahnemühle FineART GmbH, Dassel
Chirurgisches Einmalskalpell	Braun Melsungen AG, Melsungen
Deckgläser, rund (12 mm Ø)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Einmalpipetten (Serologische Pipette) 5 ml, 10 ml, 25 ml (gestopft)	Sarstedt, Nümbrecht
Filterspitze (10 µl, 1-20 µl, 1-200 µl, 101-1000 µl)	STARLAB GmbH, Hamburg

Immobilon-P PVDF-Membran Porengröße 0,45 µm	Carl Roth, Karlsruhe
Kanüle Microlance™3 (0,4 × 19 mm)	BD Medical, Franklin Lakes, USA
Kanüle Microlance™3 (0,8 × 40 mm)	BD Medical, Franklin Lakes, USA
Kryogefäß	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Kryogefäß CryoPure 1,6 ml mit Kodierplättchen	Sarstedt, Nümbrecht
Multiwellplatte für die Zellkultur (6 well, 12 well, 24 well, 96 well)	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich und Sarstedt, Nümbrecht
Norm-Ject® 1 ml Spritzen	HSW, Tuttlingen
Objektträger 76 × 26 mm, Mattrand	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Parafilm® M	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA
Pasteurpipetten, 150 mm, AR-Glas	Kobe, Marburg
Petrischale (92 × 16 mm)	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen (10 µl, 200 µl, 1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäß (0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäß, 1,5 ml, Schraubverschluss	neoLab, Heidelberg
Röhre PP (15 ml, 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Röntgenfilme Fuji Super RX	Ernst Christiansen GmbH, Planegg
Schlauchfolie, 150 mm	Kobe, Marburg
Spritzenvorsatzfilter, PES 0,2 µm, steril	VWR, Radnor, USA
Sterilindikatorband für Dampfsterilisation	Carl Roth, Karlsruhe
Thermo-Fast®96, non-skirted, PCR-Platte für die qPCR	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Ultrazentrifugenröhrchen Microfuge Tube	Beckmann, München
Zellkulturschalen (60 × 15 mm, 100 × 20 mm, 150 × 20 mm)	Sarstedt, Nümbrecht
Zellschaber, 16 cm	Sarstedt, Nümbrecht
Zentrifugenröhrchen, 13 ml	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich

3.1.3 Chemikalien

3.1.3.1 Allgemeine Chemikalien

Name	Firma
1,4-Piperazindiethanschwefelsäure (PIPES)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Pufferqualität	
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
2-Propanol	VWR, Radnor, USA
Agar-Agar	Carl Roth, Karlsruhe
Agarose NEE0	Carl Roth, Karlsruhe
Albumin Fraktion V (Bovines Serumalbumin; BSA)	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ampicillin Natriumsalz	AppliChem GmbH, Darmstadt
Aprotinin	Carl Roth, Karlsruhe und AppliChem GmbH, Darmstadt
Betain	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Blasticidin	PAA, Pasching, Österreich
Bromphenolblau	Merck Millipore, Billerica, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO) für die Zellkultur	AppliChem GmbH, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Carl Roth, Karlsruhe
EGTA (Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure)	Carl Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol, vergällt mit MEK	Chemikalienlager Philipps- Universität Marburg
Ethidiumbromid	Carl Roth, Karlsruhe
Formaldehydlösung 37 %	Carl Roth, Karlsruhe
Geneticindisulfat (G418)	Carl Roth, Karlsruhe und PAA, Pasching, Österreich
Gigasept AF Instrumentendesinfektion	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt
Glycerol 99,5 %	GERBU Biotechnik GmbH, Wieblingen

Glycin	Carl Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Carl Roth, Karlsruhe
Hühnerserum	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Immersionsöl Typ F	Leica, Wetzlar
Kaninchenserum	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Leupeptin Hemisulfat	AppliChem GmbH, Darmstadt und Carl Roth, Karlsruhe
Methanol	VWR, Radnor, USA
Methanol	Chemikalienlager Philipps- Universität Marburg
Milchpulver Blotting Grade	Carl Roth, Karlsruhe
Molecular Grade RNase-free water	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Natriumazid	Merck Millipore, Billerica, USA
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumfluorid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Natriumhydroxid p.a. in Plätzchen	Carl Roth, Karlsruhe
Nonidet P-40	United States Biological, Marblehead, USA
Orange G	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Pepton aus Casein, tryptisch verdaut	Carl Roth, Karlsruhe
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Propan-2-ol	VWR, Radnor, USA
Puromycin	PAA, Pasching, Österreich
Rotiphorese Gel 30	Carl Roth, Karlsruhe
Saponin	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
SDS-Pellets	Carl Roth, Karlsruhe
Terralin Liquid	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) PUFFERAN® min. 99,3 %, Buffer Grade	Carl Roth, Karlsruhe
Triton X-100	AppliChem GmbH, Darmstadt
Tween®20	AppliChem GmbH, Darmstadt

Urea	GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK
Wasser für Chromatographie LiChrosolv®	VWR, Radnor, USA
Wasser HiPerSolv® CHROMANORM® für HPLC	VWR, Radnor, USA
Wasser ROTISOLV® HPLC Gradient Grade	Carl Roth, Karlsruhe
Wasserbadkonservierer	Carl Roth, Karlsruhe
Water Molecular Biology Reagent	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ziegenserum	PAA, Pasching, Österreich

3.1.3.2 Spezielle Chemikalien

Name	Firma
Harmin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Rekombinantes humanes basisches FGF (FGF-2)	R&D Systems, Minneapolis, USA
SAG („Smoothened Agonist“)	Merck Millipore, Billerica, USA

3.1.4 Kits, Lösungen, Medien und Puffer

3.1.4.1 Allgemein

Name	Firma/Zusammensetzung
PBS („Phosphate buffered saline“)	6,5 mM Na ₂ HPO ₄ 1,5 mM KH ₂ PO ₄ 2,5 mM KCl 140 mM NaCl in H ₂ O (reinst) eingestellt auf pH 7,2
H₂O (reinst)	Reinstwassersystem, Ultra Clear, UV plus (SG-Wasseraufbereitung & Regenerierstation GmbH, Barsbüttel) Reinstwassersystem Milli-Q Water System (Millipore, Eschborn)
H₂O (PCR)	Wasser für Chromatographie LiChrosolv® (VWR, Radnor, USA) Wasser HiPerSolv® CHROMANORM® für HPLC (VWR, Radnor, USA) Wasser ROTISOLV® HPLC Gradient Grade (Carl Roth, Karlsruhe)
H₂O (RNase-frei)	Molecular Grade RNase-free water (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)

3.1.4.2 Zellkultur

Name	Firma/Zusammensetzung
BM Cyclin	Roche, Risch, Schweiz
DharmaFECT 1	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Invitrogen, Carlsbad, USA
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS Dulbecco)	Invitrogen, Carlsbad, USA
Einfriermedium	25 % FBS 7,5 % DMSO 1× Penicillin/Streptomycin in DMEM
Fetales Kälberserum (FBS)	PAA, Pasching, Österreich
Lipofectamine® RNAiMAX	Invitrogen, Carlsbad, USA
MEF Nucleofector® Kit 1	Lonza, Basel, Schweiz
Opti-MEM® I, GlutaMAX™	Invitrogen, Carlsbad, USA
PEI-Transfektionslösung	0,09 % PEI in H ₂ O (reinst) eingestellt auf pH 7 steril filtriert
Penicillin (10000 U/ml)/ Streptomycin (10 mg/ml) (100×)	PAA, Pasching, Österreich
Selektionsantibiotika	Blasticidin S (1000×) 5 mg/ml in H ₂ O (reinst) G418 (100×) 100 mg/ml in DMEM Puromycin (1000×) 2 mg/ml in H ₂ O (reinst)
Trypsin/EDTA	PAA, Pasching, Österreich
Trypsin/EDTA	Invitrogen, Carlsbad, USA
X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent	Roche, Risch, Schweiz

3.1.4.3 Molekularbiologische Methoden

Name	Firma/Zusammensetzung
10× Auftragspuffer	50 % Glycerol

	in H ₂ O (reinst) Orange G nach Belieben
50× TAE Laufpuffer (Tris-Acetat EDTA)	2 M Tris Base 250 mM Essigsäure 50 mM EDTA in H ₂ O (reinst) eingestellt auf pH 8
ABsolute™QPCR SYBR®Green Mix	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
dNTP Mix (je 10 mM)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Größenmarker	O'GeneRuler™1 kb DNA Ladder, ready-to-use (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) 100 bp DNA Ladder (New England Biolabs, Ipswich, USA)
ImmoMix™	Bioline, London, UK
iScript™cDNA Synthesis Kit	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
LB-Agar („Lysogeny broth“-Agar)	LB-Medium mit 1 % (w/v) Agar-Agar eingestellt auf pH 7,5
LB-Medium („Lysogeny broth“-Medium)	1 % (w/v) Pepton 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 1 % NaCl in H ₂ O (reinst) eingestellt auf pH 7,5
NucleoBond®Xtra Midi	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin®Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin®Plasmid	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin®RNA II	Macherey-Nagel, Düren
Omniscript™RT 200	Qiagen, Hilden
pEF6/V5-His TOPO®TA Expression Kit	Invitrogen, Carlsbad, USA
RiboLock RNase Inhibitor	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Selektionsantibiotika	Ampicillin (1000×) 100 mg/ml in H ₂ O (reinst) Kanamycin (1000×) 30 mg/ml in H ₂ O (reinst)

3.1.4.4 Proteinbiochemische Methoden

Name	Firma/Zusammensetzung
10× TBS-T („Tris buffered saline with Tween“)	250 mM Tris 1,5 M NaCl 1 % Tween 20 in H ₂ O (reinst) eingestellt auf pH 8
10× Blotpuffer	250 mM Tris 1,92 M Glycin 0,037 % SDS in H ₂ O (reinst) 1× Puffer enthält zusätzlich 20 % Methanol
10× SDS-Laufpuffer	250 mM Tris 1,92 M Glycin 1 % SDS in H ₂ O (reinst)
5× SDS-Probenpuffer	250 mM Tris pH 6,8 10 % SDS 30 % Glycerin 5 % 2-Mercaptoethanol optional: + 0,025 % Bromphenolblau in H ₂ O (reinst)
Beetle-Juice BIG KIT	Pjk, Kleinblittersdorf
F-AKTIN Depolymerisierungslösung	8 M Urea in H ₂ O (reinst)
Größenmarker	PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
Ionic Detergent Compatibility Reagent (IDCR)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
IPH-Puffer	50 mM Tris (pH 8,0) 150 mM NaCl 0,5 % NP-40 5 mM EDTA 1 mM DTT in H ₂ O (reinst)

	Proteaseinhibitoren (1 mM DTT, 1 mM PMSF, 50 µg/ml Aprotinin, 50 µg/ml Leupeptin)
Lyse- und F-AKTIN-Stabilisierungs-Puffer (LAS)	50 mM PIPES pH 6,9 50 mM NaCl 5 mM MgCl ₂ 5 mM EGTA 5 % Glycerol 0,1 % Nonidet P40 0,1 % Triton X-100 0,1 % Tween 20 0,1 % 2-Mercaptoethanol Frisch dazu: 1 mM DTT 1 mM PMSF 50 µg/ml Aprotinin 50 µg/ml Leupeptin 1 mM ATP in H ₂ O (reinst)
Lysis-Juice 1	Pjk, Kleinblittersdorf
Lysis-Juice 2	Pjk, Kleinblittersdorf
Passive Lysis Buffer	Promega, Fitchburg, USA
Phalloidin-California Red Conjugate	Biomol GmbH, Hamburg
Pierce®660nm Protein Assay	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Pierce®ECL Western Blotting Substrate	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Protein A-Sepharose® 4B, Fast Flow from Staphylococcus aureus	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Protein G Sepharose®, Fast Flow	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Renilla-Juice BIG KIT	Pjk, Kleinblittersdorf
Sammelgel	4-5 % Acrylamid/Bisacrylamid 125 mM Tris-HCl (pH 6,8) 0,1 % SDS 0,1 % APS 0,1 % TEMED in H ₂ O (reinst)

Super Signal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Texas Red®-X Phalloidin	Invitrogen, Carlsbad, USA
Trenngel	7-15 % Acrylamid/Bisacrylamid 375 mM Tris-HCl(pH 8,8) 0,1 % SDS 0,1 % APS 0,04-0,08 % TEMED in H ₂ O (reinst)
VECTASHIELD® Mounting Medium with DAPI	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA
β-Gal-Juice PLUS	Pjk, Kleinblittersdorf

3.1.5 Enzyme

Die Enzyme wurden mit den jeweils passenden Puffern der angegebenen Firmen benutzt.

Name	Firma
DreamTaq™ DNA Polymerase	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Pfu DNA Polymerase (rekombinant)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Restriktionsendonukleasen	Invitrogen, Carlsbad, USA; New England Biolabs, Ipswich, USA und Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
T4 DNA Ligase	New England Biolabs, Ipswich, USA

3.1.6 Antikörper

3.1.6.1 Primärantikörper

Für die Westernblotanalyse wurden die Antikörper entweder in 5 % Milchpulver in TBS-T (MP) oder in 5 % BSA in TBS-T (BSA) verdünnt.

Protein/Epitop	Organismus	Größe [kDa]	Verdünnung	Firma	Katalaognummer
Acetyliertes αTUBULIN (6-11B-1)	Maus	55	IF: 1:2000	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	T6793

c-Myc (9E10)	Maus	67	WB: 1:1000 (MP)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA	sc-40
Detyrosiniertes αTUBULIN	Kaninchen	50	IF: 1:500	Abcam, Cambridge, UK	ab48389
DYRK1A	Kaninchen	90	WB: 1:1000 (BSA)	Cell Signaling, Danvers, USA	2771S
FLAG™	Kaninchen	-	WB: 1:10000 (MP/BSA) IP: 1 µl pro 10 cm Schale	Biomol GmbH, Hamburg	600-401-383
FLAG™ (M2)	Maus	-	WB: 1:11000 (MP)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	F1804
GLI1 (L42B10)	Maus	160	WB: 1:1000 (BSA)	Cell Signaling, Danvers, USA	2643S
GLI3	Ziege	85	WB: 1:1000 (MP)	R&D Systems, Minneapolis, USA	AF3690
HA.11 (16B12)	Maus	-	WB: 1:1000 (MP)	Covance, California, USA	MMS-101P
Lamin B (M-20)	Ziege	72	WB: 1:1000 (MP)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA	sc-6217
SUFU (M-15)	Ziege	54	WB: 1:1000 (MP)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA	sc-10934
V5	Maus	-	WB: 1:5000 (MP)	Invitrogen, Carlsbad, USA	R96025
V5	Kaninchen	-	IP: 1 µl pro 10 cm Schale	Bethyl Laboratories, Montgomery	A190-120A

βAKTIN (AC-15)	Maus	42	WB: 1:10000 (MP)	Sigma-Aldrich, St. Louis, US	A5441
-----------------------	------	----	----------------------------	---------------------------------	-------

3.1.6.2 Sekundärantikörper für die Westernblotanalyse

Spezifität	Konjugat	Organismus	Verdünnung	Firma	Katalognummer
Kaninchen	Meerrettich-Peroxidase	Pferd	1:5000	New England Biolabs, Ipswich, USA	NEB7076S
Maus	Meerrettich-Peroxidase	Ziege	1:5000	New England Biolabs, Ipswich, USA	NEB7074S
Ziege	Meerrettich-Peroxidase	Esel	1:3300	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA	sc-2020
Ziege	Meerrettich-Peroxidase	Rind	1:3300	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA	sc-2350

3.1.6.3 Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenz

Spezifität	Konjugat	Organismu	Verdünnung	Firma	Katalognummer
Kaninchen	Alexa Fluor® 488	Ziege	1:400	Invitrogen, Carlsbad, USA	A-11070
Maus	Alexa Fluor® 594	Esel	1:400	Invitrogen, Carlsbad, USA	A-21203

3.1.7 Bakterienstämme

<i>E. coli</i> -Stamm	Genotyp	Referenz/Firma
DH5α	F ⁻ endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80d _{lacZ} ΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169, hsdR17(r _K ⁻ m _K ⁺), λ ⁻	Addgene, Cambridge, USA

TOP10	F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Str ^R) endA1 λ ⁻	Invitrogen, Carlsbad, USA
TOP10F'	F'[lacI ^q Tn10(tet ^R)] mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 deoR nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL(Str ^R) endA1 λ ⁻	Invitrogen, Carlsbad, USA
XL1-Blue	endA1 gyrA96(nal ^R) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F' [::Tn10 proAB ⁺ lacI ^q Δ(lacZ)M15] hsdR17(r _K ⁻ m _K ⁺)	Agilent Technologies, Santa Clara, USA

3.1.8 Plasmide

Name	cDNA	Spezies	Markierung/ Besonderheit	Referenz/Firma
12xGliLuc	Luziferase	<i>Photinus pyralis</i>	-	P. Kogerman (Kogerman et al., 1999)
8xGliLuc	Luziferase	<i>Photinus pyralis</i>	-	H. Sasaki (Sasaki et al., 1997)
8xmut.Gli	Luziferase	<i>Photinus pyralis</i>	-	H. Sasaki (Sasaki et al., 1997)
ABLIM1-Flag	ABLIM1	<i>Homo sapiens</i>	Flag	N. Frey (Barrientos et al., 2007)
ABLIM2-flag	ABLIM2	<i>Mus musculus</i>	Flag	N. Frey (Barrientos et al., 2007)
CMV-DYRK2	DYRK2	<i>Homo sapiens</i>	-	J. Taipale (Varjosalo et al., 2008)
DYRK1A-HA	DYRK1A	<i>Rattus norvegicus</i>	HA	P. Kogerman (Mao et al., 2002)

DYRK1A-K188R-HA	DYRK1A	<i>Rattus norvegicus</i>	HA, Mutation von Lysin 188 zu Arginin	P. Kogerman (Mao et al., 2002)
DYRK1A-V5	DYRK1A	<i>Rattus norvegicus</i>	V5, His	M. Lauth, B. Wilke
DYRK2-V5	DYRK2	<i>Homo sapiens</i>	V5, His	Diese Arbeit
DYRK3-V5	DYRK3	<i>Homo sapiens</i>	V5, His	Diese Arbeit
DYRK4-V5	DYRK4	<i>Homo sapiens</i>	V5, His	Diese Arbeit
EGFP-DYRK1A	DYRK1A	<i>Rattus norvegicus</i>	EGFP	W. Becker (Becker et al., 1998)
EGFP-DYRK3	DYRK3	<i>Homo sapiens</i>	EGFP	W. Becker
GLI1-EGFP	GLI1	<i>Homo sapiens</i>	EGFP	P. Kogerman (Kogerman et al., 1999)
GLI1-Flag	GLI1	<i>Homo sapiens</i>	Flag	T. Shimokawa (Shimokawa et al., 2008)
GLI1-S102/104/130/132A-EGFP	GLI1	<i>Homo sapiens</i>	EGFP, Mutationen von Serin 102, 104, 130 und 132 zu Alanin	Diese Arbeit
GLI1-S102/104/130/132A-Flag	GLI1	<i>Homo sapiens</i>	Flag, Mutationen von Serin 102, 104, 130 und 132 zu Alanin	M. Lauth, B. Wilke
GLI1-S102/104/130/132D-GFP	GLI1	<i>Homo sapiens</i>	EGFP, Mutationen von Serin 102, 104, 130 und 132 zu Aspartat	Diese Arbeit

GLI1ΔN-EGFP	GLI1ΔN	<i>Homo sapiens</i>	EGFP	T. Shimokawa (Shimokawa et al., 2008)
GLI1ΔN-Flag	GLI1ΔN	<i>Homo sapiens</i>	Flag	T. Shimokawa (Shimokawa et al., 2008)
GLI2-EGFP	GLI2	<i>Mus musculus</i>	EGFP	T. Shimokawa (Lauth et al., 2010)
H2B-EGFP	H2B	<i>Homo sapiens</i>	EGFP	Plasmid 21210, Addgene, Cambridge, USA (Kita-Matsuo et al., 2009)
HA-DYRK4	DYRK4	<i>Homo sapiens</i>	HA	W. Becker
HA-GLI1	GLI1	<i>Homo sapiens</i>	HA	P. Kogerman (Kogerman et al., 1999)
LacZ-V5	β-Galactosidase	-	V5, His	Invitrogen, Carlsbad, USA
MKL1-GFP-Myc	MKL1	<i>Homo sapiens</i>	GFP, Myc	C. Baarlink (Baarlink et al., 2013)
Myc-SUFU	SUFU	<i>Homo sapiens</i>	Myc	P. Kogerman (Kogerman et al., 1999)
pcDNA3.1	-	-	Leervektor	Invitrogen, Carlsbad, USA
pEF-MCSv1	-	-	V5-Leervektor	M. Lauth
pEGFP C1	-	-	EGFP-Leervektor	Clontech, Mountain View, USA

pEGFP-N3	-	-	EGFP-Leervektor	Clontech, Mountain View, USA
pFlag-MKL1	MKL1	<i>Homo sapiens</i>	Flag	Plasmid 11978, Addgene, Cambridge, USA (Cen et al., 2003)
pRL-TK	Luziferase	<i>Renilla reniformis</i>	-	Promega, Fitchburg, USA
pSV-R	Luziferase	<i>Renilla reniformis</i>	-	Promega, Fitchburg, USA
pSV-βGal	β-Galactosidase	-	-	Promega, Fitchburg, USA
shGFP	-	-	Kontroll-shRNA	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
shhSUFU#2	-	<i>Homo sapiens</i>	shRNA gegen humanes SUFU	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
shhSUFU#5	-	<i>Homo sapiens</i>	shRNA gegen humanes SUFU	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
SRE-Luc	Luziferase	<i>Photinus pyralis</i>	-	Promega, Fitchburg, USA
SUFU-V5	SUFU	<i>Homo sapiens</i>	V5, His	M. Lauth

3.1.9 Primer (Oligonukleotide)

Die Synthese der Oligonukleotide erfolgte durch die Firmen Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) und MWG-Biotech (Ebersberg). Die Oligonukleotide wurden nach Herstellerangaben in H₂O (PCR) gelöst. Die Konzentration betrug 100 µM.

3.1.9.1 Primer für die Reverse Transkription mit Omniscript™ RT 200

Name	Sequenz
Oligo-dT	5'-TTTTTTTTTTTTTTTT-3'

3.1.9.2 Primer für den Mykoplasmentest

Name	Sequenz	Quelle
GPO-1	5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTA-3'	(Dussurget und Roulland-Dussoix, 1994)
MGSO	5'-TGCACCATCTGTCACTCTGTTAACCTC-3'	(Dussurget und Roulland-Dussoix, 1994)

3.1.9.3 Primer für die Sequenzierung

Name	Sequenz
BGH_rev	5'-TAGAAGGCACAGTCGAGG-3'
CMV_for	5'-CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG-3'
T7_for	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'
hGLI1_s1	5'-ATGTTCAACTCGATGACC-3'
hGLI1_s2	5'-TGCTGGTGGTTCACATGC-3'
hGLI1_s3	5'-AGTATCCAGGATACAACC-3'
hGLI1_s4	5'-AGTATCCAGGATACAACC-3'
hGLI1_s5	5'-CTGGACTCTCTTGATCTTG-3'
hGLI1_s6	5'-CTGGACTCTCTTGATCTTG-3'

3.1.9.4 Primer für die Klonierung

Name	Sequenz
GLI1mim-1	5'-CGCAAATGGGCGGTAGGCGTGACG-3'
GLI1mim-2	5'-CGAGGGAGTCGGGATCGGTGCG-3'
GLI1mim-3	5'-GGCACCATGGACCCAGATCTGGGATTC-3'
GLI1mim-4	5'-CTCTCTCGAGGTCTCCCGCCC-3'
GLI1mim-5	5'-GAATCCCAGATCTGGGTCCATGGTGCC-3'
hDYRK2_For	5'-ATGAATGATCACCTGCATGTCGG-3'
hDYRK2_Rev	5'-GCTAACAAGTTTTGGCAAACTG-3'
hDYRK3_Rev	5'-GCTAATCAGTTTTGGCAATACAC-3'

hDYRK3b_For	5'-ATGAAGTGGAAAGAGAAGTTGGGGG-3'
hDYRK4_For	5'-ATGCCGGCCTCAGAGCTCAAGG-3'
hDYRK4_Rev	5'-TACAATAGGGGGTAAAACGTTTG-3'

3.1.9.5 Primer für die quantitative Echtzeit PCR

3.1.9.5.1 Humane Primer für die quantitative Echtzeit PCR

Name	Orientierung	Sequenz Reverse
DYRK1A	Forward	5'-GGAAAACGGGAGTACAAACCACCAGGA-3'
	Reverse	5'-GACCGTATGACCTGACTCCCCAGCA-3'
GLI1	Forward	5'-TCTGGACATACCCACCTCCCTCTG-3'
	Reverse	5'-ACTGCAGCTCCCCAATTTTCTGG-3'
P0	Forward	5'-CCTTCTCCTTTGGGCTGGTCATCCA-3'
	Reverse	5'-CAGACACTGGCAACATTGCGGACAC-3'
PTCH1	Forward	5'-CCGCCTTCGCTCTGGAGCAGATT-3'
	Reverse	5'-TCTGAAACTTCGCTCTCAGCCACAGC-3'

3.1.9.5.2 Murine Primer für die quantitative Echtzeit PCR

Name	Orientierung	Sequenz
Ablim1	Forward	5'-GTGACCAACAGAGGGCGCAACAAAA-3'
	Reverse	5'-TCATGTCGTTGCGTCTCAAAGAGGT-3'
Ablim2	Forward	5'-TGTGAAACTGCCCAAAGACGTGGAC-3'
	Reverse	5'-AGGCGGTCAAACCTCGATGCTC-3'
Acta2	Forward	5'-CCTGGAGAAGAGCTACGAACTGCCTGA-3'
	Reverse	5'-TTTCGTGGATGCCCGCTGACTC-3'
Brg1	Forward	5'-AGCCGGTTGTGAGTGACGATGACAG-3'
	Reverse	5'-CCTCGGGGTCAGGACTCAGGAATGT-3'
Ccnd1	Forward	5'-ACCGCACAAACGCACTTCTTTCCAG-3'
	Reverse	5'-TCTTCCTCACTTCCCCCTCCTCT-3'
Dyrk1a	Forward	5'-CAGCTCTTGTCAGTTGGGGCAGAGG-3'
	Reverse	5'-TCCAAGGACCACATGTCGATAGCA-3'
Gli1	Forward	5'-CCCATAGGGTCTCGGGGTCTCAAAC-3'
	Reverse	5'-GGAGGACCTGCGGCTGACTGTGTAA-3'
Hhip	Forward	5'-TGGCTCCCATCGGCTCTTCATTCTA-3'
	Reverse	5'-AGGCTTAGCAGGCCCTTTCGTCTC-3'

Kdm3a	Forward	5'-CCTGAGAACCTGATGCCCACACAGA-3'
	Reverse	5'-TTGGCCTTTATGCCCCATTTTGCTC-3'
Mkl1	Forward	5'-ATAAGAGTGCTGATGGCCCTGGCTTG-3'
	Reverse	5'-CTTCAGCAGAGATGTGGGGGTTGC-3'
Mkl2	Forward	5'-GAGGAAGCCATCAAGCAGGCACGTA-3'
	Reverse	5'-GAGGTCGTCCATCTGCTGACTGTGC-3'
P0	Forward	5'-TGCACTCTCGCTTTCTGGAGGGTGT-3'
	Reverse	5'-AATGCAGATGGATCAGCCAGGAAGG-3'
Ptch1	Forward	5'-CGCCTTCGCTCTGGAGCAGATTTC-3'
	Reverse	5'-TGAGGAGACCCACAACCAAAACTGC-3'
Ptch2	Forward	5'-CCCGTGGTAATCCTCGTGGCCTCTAT-3'
	Reverse	5'-TCCATCAGTCACAGGGGCAAAGGTC-3'
Rasl11b	Forward	5'-TCATCGGGGACTACGAACGAAATGC-3'
	Reverse	5'-ACTGCTCGCTGCAACTCAAGCCATT-3'
Smo	Forward	5'-GAGGAGCCATATTGCCCCAGGATGT-3'
	Reverse	5'-TCCGGCCCAACGCTTCTCTAACTC-3'
Srf	Forward	5'-TCTCGTGACAGCAGCACAGACCTCA-3'
	Reverse	5'-GAGGTGGGGGCATACATCACTGCAT-3'
Wif1	Forward	5'-CACGAACCCAACAAGTGCCAGTGTC-3'
	Reverse	5'-TTAAGTGAAGGCGTGTGTCGCTCCA-3'

3.1.10 siRNA

3.1.10.1 Kontroll-siRNA

Name	Zielsequenz	Firma
Kontroll-siRNA#1 (siLuc)	5'-UAAGGCUAUGAAGAGAUAC-3'	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Kontroll-siRNA#2 (siALL)	5'-AAUUCUCCGAACGUGUCACGU-3'	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

3.1.10.2 Humane siRNA

Alle verwendeten siRNAs gegen humane mRNAs waren von Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA).

Name	Zielsequenz	Katalognummer
sihDYRK1A#1	5'-UAAGGAUGCUUGAUUAUGA-3'	D-004805-01-0005
sihDYRK1A#2	5'-GCUAAUACCUUGGACUUUG-3'	D-004805-02-0005

3.1.10.3 Murine siRNA

Alle verwendeten siRNAs gegen murine mRNAs waren von Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA).

Name	Sequenz	Katalognummer
simDyrk1a#1	5'-GAAAUCGACUCCUAAUAG-3'	D-040110-01
simDyrk1a#2	5'-GAAUGAAGUACUACAUAG-3'	D-040110-02
simDyrk1a#3	5'-GAACCUAACACGAAAGUUU-3'	D-040110-03
simDyrk1a#4	5'-GGAUGUAUCUUGGUUGAAA-3'	D-040110-04
simDyrk1a#Pool	Pool aus gleichen Mengen simDyrk1a#1, simDyrk1a#2, simDyrk1a#3 und simDyrk1a#4	MU-040110-01-0002
simAblim1#1	5'-CCACAGACUUCGCUCAGUA-3'	D-059643-01
simAblim1#2	5'-CAACAGAGGGCGCAACAAA-3'	D-059643-02
simAblim1#3	5'-GGAUCAACAUUUACCGAAA-3'	D-059643-03
simAblim1#4	5'-GUGUAUAGCCGGCACAGUU-3'	D-059643-04
simAblim1#Pool	Pool aus gleichen Mengen simAblim1#1, simAblim1#2, simAblim1#3 und simAblim1#4	MU-059643-01-0002
simAblim2#1	5'-GGAAACUCCUCAAUGCAGA-3'	D-058308-01
simAblim2#2	5'-GAUAACAUCUAUAGGAAAC-3'	D-058308-02,
simAblim2#3	5'-GUAACAAACCGAAUUCGUG-3'	D-058308-03
simAblim2#4	5'-GAUGAUCGGUCCUACAAGC-3'	D-058308-04
simAblim2#Pool	Pool aus gleichen Mengen simAblim2#1, simAblim2#2, simAblim2#3 und simAblim2#4	MU-058308-01-0002
simMkl1#1	5'-GCAAUGGCAUGGUGAAGUU-3'	D-054350-01
simMkl1#2	5'-GACCGAGGACUAAUUGAAA-3'	D-054350-02
simMkl1#3	5'-UGAAGGAGGCUAUCAUUGU-3'	D-054350-03
simMkl1#4	5'-CAGCACGGGUGAUGAGAAU-3'	D-054350-04

simMkl1#Pool	Pool aus gleichen Mengen simMkl1#1, simMkl1#2, simMkl1#3 und simMkl1#4	MU-054350-01-0002
simMkl2#1	5'-AGUCUGUGGCUCACGAAUU-3'	J-041503-09
simMkl2#2	5'-GCACUUCGAGGAUAGAAAU-3'	J-041503-10
simMkl2#3	5'-GUGUUUGGAUGGUUGACAA-3'	J-041503-11
simMkl2#4	5'-ACUGGGAAGUUGAUAGCAA-3'	J-041503-12
simMkl2#Pool	Pool aus gleichen Mengen simMkl2#1, simMkl2#2, simMkl2#3 und simMkl2#4	LU-041503-01
simSrf#1	5'-GAGUAUUAGCUGACCCGAU-3'	J-050116-09
simSrf#2	5'-UUGAGGAGAUGACGUGAAA-3'	J-050116-10
simSrf#3	5'-GAUGAUCUGCUGACGUUUA-3'	J-050116-11
simSrf#4	5'-GCACAGUGUCCCCGUCCGA-3'	J-050116-12
simSrf#Pool	Pool aus gleichen Mengen simSrf#1, simSrf#2, simSrf#3 und simSrf#4	LU-050116-01-0002
simBrg1#1	5'-GAGCGAAUGCGGAGGCUUA-3'	J-041135-05
simBrg1#2	5'-CAAACUGGGCGUAUGAAUU-3'	J-041135-06
simBrg1#3	5'-GAGACUAUCCUCAUUAUUC-3'	J-041135-07
simBrg1#4	5'-GAUCCUCACUGGCACAGAU-3'	J-041135-08
simBrg1#Pool	Pool aus gleichen Mengen simBrg1#1, simBrg1#2, simBrg1#3 und simBrg1#4	LU-041135-00
simKdm3a#1	5'-GUAUGACAGUGAAGCGAUU-3'	J-056510-05
simKdm3a#2	5'-GGAAGUAGACCUAGUCAAU-3'	J-056510-06
simKdm3a#3	5'-CCUUGUUGGUUCAGAAGUA-3'	J-056510-07
simKdm3a#4	5'-CGGUGUGGGUUUGGAGUAU-3'	J-056510-08
simKdm3a#Pool	Pool aus gleichen Mengen simKdm3a#1, simKdm3a#2, simKdm3a#3 und simKdm3a#4	LU-056510-00
simSmo#1	5'-CAAUUGGCCUGGUGCUUUAU-3'	J-041026-05
simSmo#2	5'-GAGCGUAGCUUCCGGGACU-3'	J-041026-06
simSmo#3	5'-GGAGUAGUCUGGUUCGUGG-3'	J-041026-07
simSmo#4	5'-GCUACAAGAACUAUCGGUA-3'	J-041026-08
simSmo#Pool	Pool aus gleichen Mengen simSmo#1, simSmo#2, simSmo#3 und simSmo#4	LU-041026-00

3.1.11 Zelllinien

3.1.11.1 ATCC®-Zelllinien

Name	Eigenschaften	ATCC®-Nummer
AsPC-1	Organismus: <i>Homo sapiens</i> Gewebe: Pankreas; entnommen von Metastase in Aszites Erkrankung: Adenokarzinom	ATCC® CRL-1682™
DAOY	Organismus: <i>Homo sapiens</i> Gewebe: Gehirn/Kleinhirn Erkrankung: Desmoplastisches Kleinhirnmedulloblastom	ATCC® HTB-186™
HEK293T	Organismus: <i>Homo sapiens</i> Zelltyp: epithelial Gewebe: Niere	ATCC® CRL-11268™
NIH3T3	Organismus: <i>Mus musculus</i> Zelltyp: Fibroblast Gewebe: Embryo	ATCC® CRL-1658™
PANC-1	Organismus: <i>Homo sapiens</i> Gewebe: Pankreas/Gang Erkrankung: Epitheloidkarzinom	ATCC® CRL-1469™
SU.86.86	Organismus: <i>Homo sapiens</i> Gewebe: Pankreas; entnommen von Metastase in der Leber Erkrankung: Duktales Karzinom	ATCC® CRL-1837™
T98G	Organismus: <i>Homo sapiens</i> Gewebe: Gehirn Erkrankung: Glioblastoma multiforme	ATCC® CRL-1690™

3.1.11.2 Andere Zelllinien

Name	Eigenschaften	Referenz
<i>Ptch1</i>^{-/-} MEF	Organismus: <i>Mus musculus</i> Zelltyp: Fibroblast Gewebe: Embryo Knockout: <i>Ptch1</i>	R. Toftgård (Goodrich et al., 1997; Taipale et al., 2000)

<i>Sufu</i>^{-/-} MEF	Organismus: <i>Mus musculus</i>	R. Toftgård (Svard et al., 2006)
	Zelltyp: Fibroblast	
	Gewebe: Embryo	
	Knockout: <i>Sufu</i>	

3.1.11.3 Stabile Zelllinien

Name	Resistenz	Referenz
MEF[SHH]	Puromycin	V. Rohnalter
NIH3T3[ABLIM1-flag]	G418	Diese Arbeit
NIH3T3[ABLIM2-flag]	G418	Diese Arbeit
NIH3T3[DYRK1A-V5]	Blasticidin	P. Holz
NIH3T3[Leervektor]	G418	Diese Arbeit
NIH3T3[pFlag-MKL1]	G418	Diese Arbeit
NIH3T3[V5-Leervektor]	Blasticidin	P. Holz
<i>Ptch1</i> ^{-/-} [DYRK1A-V5]	Blasticidin	Diese Arbeit
<i>Ptch1</i> ^{-/-} [V5-Leervektor]	Blasticidin	Diese Arbeit
Shh-LIGHT2	G418	R. Toftgård (Taipale et al., 2000)
<i>Smo</i> ^{-/-} [DYRK1A-V5]	Blasticidin	M. Lauth
<i>Smo</i> ^{-/-} [LacZ-V5]	Blasticidin	M. Lauth
<i>Sufu</i> ^{-/-} [DYRK1A-V5]	Blasticidin	Diese Arbeit
<i>Sufu</i> ^{-/-} [V5-Leervektor]	Blasticidin	Diese Arbeit

3.1.12 Computerprogramme und Datenverwaltung

3.1.12.1 Software

Name	Firma
Microsoft® Office 2007, 2010, 2013 (Excel®, PowerPoint®, Word®)	Microsoft, Unterschleißheim
Adobe® Reader® IX	Adobe Systems Inc., San Jose, USA
EndNote® X7	Thomson Reuters, New York City, USA
ImageJ (Version 1.47)	Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA
Measurement Software NanoDrop 1000 (Version 3.7.1)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
GelQuant.NET (Version 1.8.2)	http://biochemlabsolutions.com/

Paint.NET (Version 3.5.11)	Washington State University, USA
Simplicity (Version 4.2)	Berthold Detection Systems, Pforzheim
PictureFrame™ Application (Version 2.3)	Optronics, Goleta, USA
Prism 6 for Windows (Version 6.03)	GraphPad Software, La Jolla, USA
Inkscape (Version 0.48)	Inkscape Community
ApE (A plasmid Editor, Version 2.0.47)	M. Wayne Davis
MxPro - Mx3000p/Mx3005P (Version 4.10)	Agilent Technologies, Santa Clara, USA

3.1.12.2 Genom- und Protein Datenbanken

Name	Adresse
National Center for Biotechnology Information	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

3.2.1.1 Kultivieren und Passagieren von Zellen

Alle in dieser Arbeit verwendeten Zellen wurden in 10 cm Schalen in „DMEM („Dulbecco's Modified Eagle Medium“), High Glucose“ (Invitrogen, Carlsbad, USA) mit 10 % fetalem Kälberserum (FBS GOLD, PAA, Pasching, Österreich) und 1× Penicillin/Streptomycin (PAA, Pasching, Österreich) (im Folgenden als Vollmedium bezeichnet) bei 37 °C, einer Atmosphäre von 5 % CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 % kultiviert. Zelllinien, die durch Transfektion und anschließender Selektion dauerhaft genetisch verändert wurden, wurden unter ständigem Selektionsdruck durch die entsprechenden Antibiotika gehalten (Blasticidin: 5 µg/ml; Geneticinsulfat (G-418): 1 mg/ml; Puromycin: 2 µg/ml). Die Zellen wurden alle zwei bis drei Tage passagiert, spätestens aber bevor sie volle Konfluenz erreichten. Dazu wurde das Medium abgesaugt, die Zellen in 10 ml PBS Dulbecco (Invitrogen, Carlsbad, USA) gewaschen und mit 1 ml Trypsin/EDTA (PAA, Pasching, Österreich; Invitrogen, Carlsbad, USA) für etwa 2-3 min bei 37 °C inkubiert, bis sie vollständig vom Schalenboden gelöst waren. Diese Zellsuspension wurde mit Vollmedium versetzt, um den Trypsinverdau zu stoppen. Nach gründlichem Resuspendieren wurde ein entsprechender Teil dieser Suspension in neue 10 cm Schalen überführt und mit 10 ml Vollmedium versetzt. Nach gleichmäßigem Verteilen der Zellen wurden diese bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

Für Experimente wurden Zellen wie oben beschrieben von einer 10 cm Schale mittels Trypsin/EDTA (PAA, Pasching, Österreich) abgelöst und die entsprechende Menge Zellen mit dem entsprechenden Volumen Vollmedium in das gewünschte Format überführt (siehe Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1: Volumen an Vollmedium für die entsprechenden Zellkulturformate.

Zellkulturformat	Volumen an Medium
96 well	200 µl
24 well	500 µl
12 well	1 ml
6 well	2 ml
6 cm Schale	5 ml
10 cm Schale	10 ml
15 cm Schale	20 ml

3.2.1.2 Kryokonservierung von Zellen

Zur Lagerung wurden die Zellen wie unter 3.2.1.1 beschrieben mit 1 ml Trypsin/EDTA (PAA, Pasching, Österreich; Invitrogen, Carlsbad, USA) von einer konfluenten 10 cm Schale gelöst und mit 2,5 ml Einfriermedium (siehe 3.1.4.2) gründlich resuspendiert und in Einfrierröhrchen (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA; Sarstedt, Nümbrecht) überführt. Um ein langsames Abkühlen der Zellen auf -80 °C zu gewährleisten und damit Kristallisationsschäden zu verhindern, wurden die Zellen in eine spezielle Einfrierbox, gefüllt mit 2-Propanol, gegeben und für mindestens 6 h bei -80 °C heruntergekühlt. Danach wurden sie für kurze Lagerzeiten bei -80 °C gelagert oder für längerfristige Lagerung in das Stickstoff-Lagersystem Chronos 350 Biosafe (Messer-Griesheim, Düsseldorf) überführt. Um eingefrorene Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurden diese in eine 10 cm Schale mit 10 ml Vollmedium überführt. Sobald sich die Zellen am Schalenboden abgesetzt hatten, wurde das Medium abgesaugt, die Zellen in PBS Dulbecco (Invitrogen, Carlsbad, USA) gewaschen und auf frisches Vollmedium gesetzt, um Rückstände von DMSO aus dem Einfriermedium zu entfernen.

3.2.1.3 Mykoplasmen

Mykoplasmen sind Bakterien der Klasse Mollicutes, die sich durch parasitäre intra- und extrazelluläre Lebensweise auszeichnen. Chronische Infektionen von im Labor verwendeten tierischen oder humanen Zelllinien können deren Funktionstätigkeit, Wachstum, Stoffwechsel sowie immunologische und biochemische Eigenschaften beeinträchtigen (Rottem und Naot, 1998). Alle in Kultur befindlichen Zellen wurden daher regelmäßig auf Kontaminationen mit Mykoplasmen kontrolliert.

3.2.1.3.1 Mykoplasmentest via PCR

Zur Untersuchung der in Kultur befindlichen Zellen auf Mykoplasmen durch PCR wurden 100 µl des Zellkulturüberstandes entnommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Dieser Überstand wurde 5 min bei 95 °C aufgeköcht und danach bei 13000 rpm (Δ 16200 \times g) für 1 min zentrifugiert. Der Überstand wurde zur Präzipitation in einem neuen 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 10 µl Tris/HCl [10 nM] (pH 8,8) gut gemischt und erneut bei 13000 rpm (Δ 16200 \times g) für 1 min zentrifugiert. Der resultierende Überstand wurde als Template der unten beschriebenen PCR eingesetzt (siehe Tabelle 3.2 und Tabelle 3.3).

Tabelle 3.2: Zusammensetzung der PCR für den Mykoplasmentest.

Komponente	Konzentration
ImmoMix™	1×
Primer GPO-1 (siehe 3.1.9.1)	0,3 µM
Primer MGSO (siehe 3.1.9.1)	0,3 µM
Template	1 µl
H ₂ O (PCR)	ad 25 µl

Tabelle 3.3: Temperaturschritte für die PCR des Mykoplasmentests.

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	5 min	
Denaturierung	95 °C	30 s	
Primeranlagerung	55 °C	30 s	35x
Elongation	72 °C	1 min	
Finale Elongation	72 °C	5 min	
Lagerung	4 °C	∞	

Die fertige PCR wurde wie unter 3.2.2.5 beschrieben auf ein Agarosegel geladen und auf Banden bei 717 bp kontrolliert (Dussurget und Roulland-Dussoix, 1994). Zellen, die positiv auf Mykoplasmen getestet wurden, wurden entweder entsorgt oder wie unter 3.2.1.3.2 beschrieben behandelt.

3.2.1.3.2 Behandlung von Mykoplasmen

Zellen, die positiv auf Mykoplasmen getestet und weiter in Kultur behalten wurden, wurden mit „BM Cyclin“ (Roche Diagnostics, Risch, Schweiz) nach Herstellerangaben behandelt. Dieses Kit, bestehend aus einem Pleuromutilinderivat und einem Tetracyclinderivat, entfernt laut Hersteller die Mykoplasmen aus infizierten Zellen ohne nennenswerte zytotoxische Nebenwirkungen. Nach ein bis zwei Wochen Behandlung wurden die Zellen erneut mittels PCR (siehe 3.2.1.3.1) auf Mykoplasmen getestet.

3.2.1.4 Transfektion von Zellen

3.2.1.4.1 Transiente Transfektion von Zellen mit Plasmid-DNA

Um die in Abschnitt 3.1.8 erwähnten DNA-Konstrukte zur kurzfristigen Proteinexpression in Zellen einzubringen, wurden diese transient transfiziert. Da die DNA nicht ohne weiteres von den Zellen aus dem Zellkulturmedium aufgenommen wird, wurde sie mit Hilfe der chemischen

Transfektionsreagenzien X-tremeGENE HP (Roche Diagnostics, Risch, Schweiz) oder Polyethylenimin (PEI) in die Zellen eingebracht. Bei beiden Verfahren wurden die Zellen so ausgesät, dass sie zum Zeitpunkt der Transfektion (mindestens 6 h später oder am nächsten Tag) eine Konfluenz von 60 %-80 % aufwiesen. Falls nicht anders erwähnt, wurden die Zellen 48 h – beziehungsweise 72 h falls shRNA-Konstrukte (ko)transfiziert wurden – nach Transfektion mit der entsprechenden Methode analysiert.

3.2.1.4.1.1 Transiente Transfektion von Plasmid-DNA mit Polyethylenimin

Polyethylenimin liegt in wässrigen Lösungen als Polykation vor und bildet aufgrund seiner Ladung Komplexe mit der stark negativ geladenen DNA. Diese Präzipitate werden von Zellen mittels Endozytose aufgenommen (Brissault et al., 2003). Bei der Transfektion mit PEI wurden entsprechend des für den Versuch verwendeten Formats zwei sterile Reaktionsgefäße vorbereitet. In einem wurde die zu transfizierende DNA in der entsprechenden Menge PBS Dulbecco (Invitrogen, Carlsbad, USA) verdünnt und in der anderen das entsprechende Volumen PEI ebenfalls in PBS Dulbecco (Invitrogen, Carlsbad, USA) verdünnt. Die genauen Mengen und Volumina können in Abhängigkeit vom verwendeten Zellkulturformat aus Tabelle 3.4 entnommen werden.

Tabelle 3.4: Volumina der für die transiente Transfektion mit PEI verwendeten Reagenzien in Abhängigkeit des Zellkulturformats.

Zellkulturformat	DNA	PEI
	PBS Dulbecco	PBS Dulbecco
24 well	600 ng	1,25 µl
	25 µl	24 µl
12 well	1 µg	2 µl
	41 µl	40 µl
6 well	2 µg	4 µl
	82 µl	80 µl
6 cm	4 µg	8 µl
	165 µl	160 µl
10 cm	8 µg	16 µl
	330 µl	320 µl

Diese beiden Lösungen wurden vereint und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, um die Komplexbildung zu ermöglichen. Für die Transfektion der Zellen wurde das Gemisch tröpfchenweise in das Zellkulturmedium gegeben und durch vorsichtiges Schwenken verteilt.

3.2.1.4.1.2 Transiente Transfektion von Plasmid-DNA mit X-tremeGENE HP

Bei der Transfektion mit X-tremeGENE HP (Roche Diagnostics, Risch, Schweiz) wurde ein steriles Reaktionsgefäß vorbereitet. In diesem Reaktionsgefäß wurde die zu transfizierende Menge DNA in dem entsprechenden Volumen „DMEM, High Glucose“ (Invitrogen, Carlsbad, USA) ohne Serum und Antibiotika (siehe Tabelle 3.5) verdünnt. Anschließend wurden 2 µl X-tremeGENE HP pro 1 µg DNA in das Reaktionsgefäß pipettiert und gemischt. Nach 20 min Inkubation bei Raumtemperatur, um die Komplexbildung zu ermöglichen, wurde das Transfektionsgemisch tröpfchenweise auf die Zellen gegeben.

Tabelle 3.5: Volumina der für die transiente Transfektion mit X-tremeGENE HP verwendeten Reagenzien in Abhängigkeit des Zellkulturformats.

Zellkulturformat	DMEM	DNA	X-tremeGENE HP
24 well	50 µl	500 ng	1 µl
12 well	100 µl	1 µg	2 µl
6 well	200 µl	2 µg	4 µl
6 cm Schale	500 µl	5 µg	10 µl
10 cm Schale	1000 µl	10 µg	20 µl

3.2.1.4.1.3 Transiente Transfektion von Plasmid-DNA mittels Elektroporation

Einige Zelllinien sind mit chemischen Transfektionsreagenzien nur sehr schwer zu transfizieren. Eine Alternative für solche Zellen bietet die Transfektion mittels Elektroporation. Dabei werden die Zellen in einer speziellen Küvette für kurze Zeit einer hohen Spannung ausgesetzt, um die Zellmembran kurzfristig zu permeabilisieren. So kann die Zelle die großen DNA-Moleküle aufnehmen (Potter und Heller, 2011). Diese Methode wurde in dieser Arbeit verwendet, um embryonale Mausfibroblasten (MEFs) mit Plasmid-DNA zu transfizieren. Dazu wurde das „MEF Nucleofector® Kit 1“ (Lonza, Basel, Schweiz) nach Herstellerangaben verwendet und die Zellen mittels des „Amaxa® Nucleofector® II“ (Lonza, Basel, Schweiz) elektroporiert. Nach erfolgter Transfektion einer konfluenten 10 cm Schale mit 8 µg DNA wurden die Zellen auf eine frische 10 cm Schale mit Vollmedium überführt (siehe 3.2.1.1).

3.2.1.4.2 Selektion stabiler Klone aus transient transfizierten Zellen

Eine transiente Transfektion erreicht – abhängig von der gewählten Zelllinie und Transfektionsart – meist nur einen kleinen Teil der Zellen und die transfizierten Plasmide werden im Laufe der Zeit ausgedünnt, da sie in den Zellen nicht, wie genomische DNA, repliziert werden. Um also Effekte einer Überexpression von Genen in einer kompletten Zellpopulation und/oder über längere Zeit beobachten zu können, müssen Zellen generiert werden, die die gewünschte

DNA stabil in ihr Genom integriert haben. Dies geschieht zu einem geringen Prozentsatz bei jeder transienten Transfektion (Murnane et al., 1990). Für die Selektion dieser Zellen wird neben dem gewünschten Gen noch ein Marker, wie etwa eine Antibiotikaresistenz, benötigt. Für den Fall, dass das transfizierte Plasmid nicht für ein solches Resistenzgen codiert, wurden zusätzliche Plasmide transfiziert, um den Zellen die Ausbildung einer Resistenz zu ermöglichen. Nach erfolgter transients Transfektion wurden die Zellen mit dem entsprechenden Antibiotikum behandelt. Das Selektionsmedium wurde dabei alle drei bis vier Tage gewechselt, um das Antibiotikum zu erneuern und tote Zellen und Debris zu entfernen. Nach erfolgreicher Selektion der polyklonalen stabilen Zelllinien wird der Selektionsdruck für die gesamte Dauer der Kultivierung aufrechterhalten. In dieser Arbeit wurden ausschließlich polyklonale Zelllinien hergestellt. Diese sind unter 3.1.11.3 aufgeführt. Die verwendeten Antibiotika sind unter 3.1.4.2 aufgelistet und wurden stets 1× konzentriert eingesetzt.

3.2.1.4.3 Transfektion von „small interfering RNA“ (siRNA)

RNA-Interferenz ist ein Mechanismus von eukaryotischen Zellen, die Expression bestimmter Gene posttranskriptionell zu regulieren. Über einen komplexen Verlauf wird dabei der sogenannten „RNA-induced silencing complex“ (RISC) über kleine komplementäre RNAs mit der Ziel-mRNA in Verbindung gebracht und führt dort zu einer translationalen Blockade oder zum Abbau der gesamten mRNA. Diesen Mechanismus macht man sich zunutze, indem man kurze RNA-Stücke in die Zelle transfiziert und so die Translation bestimmter mRNAs verhindert. Da synthetische siRNAs meist komplett komplementär zu der Ziel-mRNA sind, wird diese in den meisten Fällen abgebaut und nicht bloß blockiert (John et al., 2003). Diese Methode eignet sich gut, um die Expression eines bestimmten Gens für eine begrenzte Zeit herunterzuregulieren. Falls nicht anders erwähnt, wurden die Zellen 72 h nach Transfektion mit der entsprechenden Methode analysiert.

3.2.1.4.3.1 Lösen von siRNA

Die lyophilisiert gelieferte siRNA (siehe 3.1.10) wurde mit einer Konzentration von 20 µM in 1× siRNA Puffer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) gelöst. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

3.2.1.4.3.2 Transfektion von siRNA mittels DharmaFECT 1

Für die Transfektion von siRNA mit DharmaFECT 1 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) wurden die Zellen in dem jeweils benötigten Format ausgesät, so dass sie zum Zeitpunkt der Transfektion (mindestens 6 h später oder am nächsten Tag) eine Konfluenz von 60-80 % aufwiesen. Die Transfektion erfolgte nach Herstellerangaben mit einer Endkonzentration von 30 nM siRNA. Die genauen Mengen der Komponenten hängen vom gewählten Format ab und

sind in Tabelle 3.6 abzulesen. Dazu wurden zwei sterile Reaktionsgefäße vorbereitet und die benötigte Menge siRNA in der entsprechenden Menge 1× siRNA-Puffer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) und DMEM (Invitrogen, Carlsbad, USA) ohne Serum und Antibiotika verdünnt. Im zweiten Gefäß wurde das Transfektionsreagenz DharmaFECT 1 in DMEM ohne Serum und Antibiotikum verdünnt. Nach gründlichem Mischen der beiden Ansätze und 20 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Transfektionsgemisch mit dem entsprechenden Volumen Vollmedium ohne Antibiotika gemischt. Die zu transfizierenden Zellen wurden mit PBS Dulbecco (Invitrogen, Carlsbad, USA) gewaschen und das Gemisch wurde vorsichtig auf die Zellen pipettiert.

Tabelle 3.6: Volumina der für die Transfektion von siRNA mit DharmaFECT 1 verwendeten Reagenzien in Abhängigkeit des Zellkulturformats.

Zellkulturformat	siRNA in 1× siRNA-Puffer	DharmaFECT 1	Vollmedium
	DMEM	DMEM	
12 well	30 pmol in 50 µl	2 µl	800 µl
	50 µl	98 µl	
6 well	60 pmol in 100 µl	4 µl	1600 µl
	100 µl	196 µl	

3.2.1.4.3.3 Transfektion von siRNA mittels „Lipofectamine® RNAiMAX“

Die Transfektion von siRNA mit „Lipofectamine® RNAiMAX“ (Invitrogen, Carlsbad, USA) erfolgte ebenfalls mit Zellen, die vor mindestens 6 h ausgesät wurden und eine Konfluenz von 60-80 % erreicht hatten. Die Transfektion erfolgte nach Herstellerangaben und mit einer Endkonzentration von 30 nM siRNA. Dazu wurden zwei sterile Reaktionsgefäße vorbereitet in denen je nach Format (siehe Tabelle 3.7) folgende Komponenten gemischt wurden. In dem ersten Gefäß wurde die siRNA in Opti-MEM® I, GlutaMAX™ (Invitrogen, Carlsbad, USA) verdünnt. Im zweiten Gefäß wurde die entsprechende Menge „Lipofectamine® RNAiMAX“ in Opti-MEM® I, GlutaMAX™ (Invitrogen, Carlsbad, USA) verdünnt und beide Lösungen am Ende miteinander vermischt. Nach 20 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde ein dem Reaktionsansatz entsprechendes Volumen an Medium von den Zellen abgenommen. Der Reaktionsansatz wurde tröpfchenweise auf die Zellen pipettiert und anschließend vorsichtig gemischt.

Tabelle 3.7: Volumina der für die Transfektion von siRNA mit Lipofectamine® RNAiMAX verwendeten Reagenzien in Abhängigkeit des Zellkulturformats.

Zellkulturformat	siRNA	Lipofectamine® RNAiMAX
	Opti-MEM® I	Opti-MEM® I
12 well	1,5 µl (30 pmol)	3 µl
	98,5 µl	100 µl
6 well	3 µl (60 pmol)	6 µl
	197 µl	200 µl

3.2.1.5 Behandlung von Zellen mit Stimulantien und Inhibitoren

Für die Behandlung von Zellen mit Stimulantien oder Inhibitoren wurden die Zellen, falls nicht anders erwähnt, 24 h vor Zugabe des jeweiligen Faktors mit PBS Dulbecco (Invitrogen, Carlsbad, USA) gewaschen und frisches DMEM mit 1 % fetalem Kälberserum und 1× Penicillin/Streptomycin auf die Zellen gegeben, um sie hungern zu lassen.

3.2.1.5.1 Behandlung der Zellen mit „Smoothened Agonist“ (SAG)

„Smoothened Agonist“ (SAG; Merck Millipore, Billerica, USA) bindet an den GPCR Smoothened und führt so zu dessen Aktivierung und zur Stimulation des HH-Signalwegs (Chen et al., 2002b). Dafür ist es von Nöten, dass das Primärzilium ausgebildet ist, was einen Proliferationsstopp der Zellen benötigt (Goetz und Anderson, 2010; Hildebrandt und Otto, 2005; Kobayashi und Dynlacht, 2011). Zellen, die mit SAG behandelt werden sollten, wurden auf Vollmedium gehalten, bis sie komplett konfluent und damit kontaktinhibiert waren. Danach wurden sie, falls nicht anders angegeben, wie oben (siehe 3.2.1.5) beschrieben, für 24 h auf Medium mit 1 % fetalem Kälberserum gesetzt, um auch die Zellen, die nicht kontaktinhibiert waren, zu einem Proliferationsstopp zu bringen und hungern zu lassen. Danach wurden die Zellen mit 100 nM SAG (gelöst in H₂O (reinst)) oder dem Lösungsmittel alleine für 24 h oder die angegebene Zeit behandelt und anschließend entsprechend analysiert.

3.2.1.5.2 Behandlung der Zellen mit rekombinalem humanen basischem Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF-2)

Fibroblasten Wachstumsfaktoren (FGFs) binden an die Rezeptor-Tyrosin-Kinase FGF-Rezeptor (FGFR), was zu einer Autophosphorylierung führt (Lee et al., 1989). Dadurch werden Signalwege aktiviert, die unter anderem eine Rolle in der Embryonalentwicklung, Differenzierung, Wundheilung und Angiogenese spielen (Coumoul und Deng, 2003; Stegmann, 1998). Bei dem hier verwendeten FGF handelt es sich um die Aminosäuren Prolin 143 bis Serin 288 des humanen basischem FGF-2 mit einem N-terminalen Alanin, welches rekombinant in *E. coli* exprimiert

wurde (R&D Systems, Minneapolis, USA). Zellen, die mit FGF-2 behandelt werden sollten, wurden auf Vollmedium gehalten, bis sie komplett konfluent waren. Danach wurden sie, falls nicht anders angegeben, wie oben (siehe 3.2.1.5) beschrieben für 24 h auf Medium mit 1 % fetalem Kälberserum gesetzt, um serumabhängige Aktivierung des FGF-Signalwegs zu minimieren. Danach wurden die Zellen mit 10 ng/ml FGF-2 (gelöst in 0,1 % BSA in PBS) oder dem Lösungsmittel alleine für 24 h oder die angegebene Zeit behandelt und anschließend entsprechend analysiert.

3.2.1.5.3 Behandlung der Zellen mit Harmin

Harmin ist ein wirksamer Inhibitor der Kinase DYRK1A (Bain et al., 2007; Gockler et al., 2009). Zellen, die mit Harmin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) behandelt werden sollten, wurden auf Vollmedium gehalten bis sie komplett konfluent waren. Danach wurden sie, falls nicht anders angegeben, wie oben (siehe 3.2.1.5) beschrieben für 24 h auf Medium mit 1 % fetalem Kälberserum gesetzt. Anschließend wurden die Zellen mit 5 μ M Harmin oder der angegebenen Konzentration (gelöst in DMSO) oder dem Lösungsmittel alleine für 24 h oder die angegebene Zeit behandelt und anschließend entsprechend analysiert.

3.2.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.2.1 Plasmidherstellung

Um Plasmide zu vermehren, werden diese in *Escherichia coli* (*E. coli*) transformiert und dort repliziert. Bakterien, die die Fähigkeit besitzen DNA aufzunehmen, nennt man kompetente Bakterien. Im Folgenden sind die Herstellung kompetenter Bakterien und deren Verwendung zur Plasmidvermehrung beschrieben.

3.2.2.1.1 Herstellung kompetenter Bakterien

Die verwendeten Bakterien wurden chemisch mittels der Calciumchlorid-Methode (Mandel und Higa, 1970; Oishi und Cosloy, 1972) kompetent gemacht. Dazu wurde eine Einzelkolonie von einer vorher ausgestrichenen LB-Agarplatte in 10 ml LB-Medium (siehe 3.1.4.3) angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 150 rpm in einem Schüttelinkubator (Infors AG, Bottmingen, Schweiz) kultiviert. Von dieser Übernachtskultur wurden 5 ml entnommen und in 500 ml frisches LB-Medium überführt. Diese Kultur wurde bei 37 °C und 150 rpm inkubiert, bis sie eine OD₆₀₀ (optische Dichte bei 600 nm) von maximal 0,4 erreicht hatten. Die Bakterien wurden auf Eis gekühlt und anschließend bei 3000 rpm (Δ 850 \times g) 15 min pelletiert. Nach Resuspension des Pellets in 200 ml 0,1 M CaCl₂ und erneuter Zentrifugation bei 3000 rpm (Δ 850 \times g) für 15 min wurde das Bakterienpellet in 20 ml eiskaltem 0,1 M CaCl₂ resuspendiert und 20 % Glycerol zugegeben. Aliquots dieser so hergestellten kompetenten Bakterien wurden bei -80 °C gelagert.

3.2.2.1.2 Transformation kompetenter Bakterien

Für die Transformation wurden entweder kompetente *E. coli* vom Stamm XL1 Blue oder TOP10 bzw. TOP10F' (siehe 3.1.7) verwendet. Die Transformation erfolgte nach Herstellerangaben. Zunächst wurden 50-100 µl der Bakterien aus 3.2.2.1.1 auf Eis aufgetaut und mit 0,5 µg Plasmid oder mit DNA bzw. Ligationsansätzen in maximal 10 % des Gesamtvolumens gemischt. Die Bakterien wurden für eine bestimmte Zeit auf Eis inkubiert (XL1 Blue: 30 min; TOP10(F'): 5-30 min) gefolgt von einem Hitzeschock bei 42 °C (XL1 Blue: 90 s; TOP10(F'): 30 s) und einer weiteren Inkubationsphase auf Eis. Die Bakterien wurden daraufhin in 250 µl vorgewärmten SOC- oder 500 µl vorgewärmten LB-Medium für 1 h bei 37 °C und 150 rpm im Schüttelinkubator kultiviert bevor verschiedene Mengen (10-200 µl) des Transformationsmixes auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen (Ampicillin: 100 µg/ml; Kanamycin: 30 µg/ml) und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurden einige der gewachsenen Kolonien mit einer sterilen Pipettenspitze von der LB-Agarplatte in 3 ml LB-Medium mit Antibiotikum überführt und bei 37 °C und 150 rpm inkubiert, bis eine deutliche Trübung des Mediums sichtbar war (mindestens 6-8 h oder über Nacht). Von einem Teil dieser Vorkulturen konnten für den späteren Gebrauch Kryostocks zur Lagerung bei -80 °C angelegt werden (siehe 3.2.2.1.5). Aus der restlichen Kultur wurde entweder direkt mittels einer Mini-Präparation (siehe 3.2.2.1.3) Plasmid-DNA isoliert oder eine größere Kultur angeimpft, welche über Nacht bei 37 °C geschüttelt wurde, um die Plasmid-DNA mittels einer Midi-Präparation (siehe 3.2.2.1.4) isolieren zu können. Diese beiden Methoden der Plasmid-DNA Isolierung werden im folgenden Abschnitt beschrieben.

3.2.2.1.3 Plasmidisolation im kleinen Maßstab (Mini-Präparation)

Zur Analyse verschiedener Klone sind kleine Mengen an Plasmid-DNA ausreichend. Die Isolation aus 2 ml Flüssigkultur (siehe 3.2.2.1.2) wurde nach Herstellerangaben mit dem Kit „NucleoSpin® Plasmid“ (Macherey-Nagel, Düren) durchgeführt. Die DNA wurde in 50 µl H₂O (PCR) aufgenommen und ihre Konzentration photometrisch über die Absorption bei 260 nm bestimmt (siehe 3.2.2.2). Die Konstrukte wurden bei -20 °C gelagert. Mit diesem Kit werden die Bakterien durch alkalische Lyse aufgebrochen und die Plasmid-DNA an eine Silica-Membran gebunden und so isoliert. Dieses Kit beruht auf der alkalischen Lyse von Bakterien und der anschließenden ethanolischen Fällung der DNA (Birnboim und Doly, 1979).

3.2.2.1.4 Plasmidisolation im mittleren Maßstab (Midi-Präparation)

Die meisten Anwendungen erfordern Plasmid-DNA in höherer Qualität und/oder Quantität. Daher ist eine Mini-Präparation in den meisten Fällen nicht ausreichend. Für eine Plasmidisolation im mittleren Maßstab wurde zunächst eine Vorkultur angeimpft. Dazu wurde eine Einzelkolonie von einer LB-Agarplatte oder aus einem Glycerolstock (siehe 3.2.2.1.5) in 3 ml

LB-Medium mit Antibiotikum angeimpft und bei 37 °C und 150 rpm inkubiert, bis eine deutliche Trübung des Medium sichtbar war (mindestens 6-8 h oder über Nacht). Alternativ konnte auch die Bakteriensuspension aus 3.2.2.1.2 verwendet werden. Diese Vorkultur wurde verwendet, um 100 ml LB-Medium mit Selektionsantibiotikum anzupflanzen. Nach Inkubation über Nacht bei 37 °C und 150 rpm wurde die Plasmid-DNA mittels des Kits „NucleoBond®Xtra Midi“ (Macherey-Nagel, Düren) nach Herstellerangaben isoliert, ihre Konzentration photometrisch über die Absorption bei 260 nm bestimmt (siehe 3.2.2.2) und die Konstrukte wurden bei -20 °C gelagert. Auch hier werden die Bakterien durch eine alkalische Lyse aufgebrochen und die Plasmid-DNA an eine Silica-Membran gebunden. Nach Lösen der DNA von der Membran mittels Ionenaustausch und anschließender ethanolischer Fällung nach Herstellerangaben wurde das Pellet je nach Größe in 100-300 µl H₂O (PCR) gelöst.

3.2.2.1.5 Herstellung von Kryostocks

Aus bereits transformierten Bakterien konnten für die spätere Verwendung Kryostocks angelegt werden. Dazu wurden 500 µl Bakteriensuspension in einem sterilen Reaktionsgefäß (1,5 ml, Schraubverschluss; neoLab, Heidelberg) mit 500 µl Glycerol versetzt und bei -80 °C gelagert.

3.2.2.2 Photometrische Bestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration und die Reinheit von Nukleinsäuren lassen sich photometrisch bestimmen. Diese Moleküle besitzen heterozyklische Basen, welche Licht mit einer Wellenlänge von 260 nm absorbieren. Mittels des NanoDrop®ND-1000 (PeqLab, Erlangen) wurde die OD₂₆₀ der aufgereinigten Plasmid-DNA bestimmt und daraus die Konzentration (ρ) der Proben nach folgenden Formeln errechnet:

$$\rho(dsDNA) \left[\frac{ng}{\mu l} \right] = OD_{260} \times 50 \frac{ng}{\mu l}$$

$$\rho(RNA) \left[\frac{ng}{\mu l} \right] = OD_{260} \times 40 \frac{ng}{\mu l}$$

Diese Berechnung wurde direkt von der mitgelieferten Software (NanoDrop 1000, Version 3.7.1) durchgeführt. Phenol und Proteine absorbieren Licht bei 280 nm. Über das Verhältnis der OD₂₆₀ und der OD₂₈₀ kann so die Reinheit der Plasmid-DNA errechnet werden. Der Quotient OD₂₆₀/OD₂₈₀ sollte zwischen 1,8 und 2,1 liegen.

3.2.2.3 Verdau von DNA (Restriktion)

Um isolierte Plasmid-DNA zu überprüfen oder um Abschnitte eines Konstruktes aus einem Vektor in einen anderen zu klonieren, kann DNA verdaut werden. Restriktionsenzyme erkennen dabei eine spezifische Sequenz auf dem Doppelstrang und schneiden diesen. Für analytische Restriktionsansätze wurden dabei je 0,5 µg DNA und für präparative Verdaus 1-5 µg DNA

eingesetzt. Der Verdau erfolgte nach den vom Hersteller empfohlenen Vorgaben für Einzel- oder Mehrfachverdaus. Die Restriktionsansätze wurden mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese analysiert (siehe 3.2.2.5) oder direkt mit dem Kit „NucleoSpin®Gel and PCR Clean-up“ (Macherey-Nagel, Düren) aufgereinigt (siehe 3.2.2.6).

3.2.2.4 Amplifikation spezifischer DNA-Abschnitte mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion wird verwendet, um spezifische Abschnitte von DNA-Molekülen zu amplifizieren. Dies geschieht unter Verwendung einer thermostabilen DNA-Polymerase in mehreren aufeinanderfolgenden Zyklen, bestehend aus Denaturierung, Primeranlagerung und Elongation. Die Denaturierung des DNA-Doppelstranges zu zwei Einzelsträngen geschieht bei 95 °C. An die nun einzelsträngig vorliegende DNA lagern sich komplementäre Primer an. Die Primer grenzen den gewünschten Bereich der zu amplifizierenden DNA ein und können so modifiziert werden, dass im Amplikon Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme entstehen oder Punktmutationen eingefügt werden. Falls ein PCR-Produkt für eine Klonierung verwendet werden soll, muss gegebenenfalls darauf geachtet werden, dass das Leseraster mit bereits auf dem Zielvektor vorhandenen Markierungen übereinstimmt. Die thermostabile Polymerase komplementiert jeden DNA-Einzelstrang zu einem neuen DNA-Doppelstrang. Die Temperatur, bei der die Polymerase am effektivsten arbeitet, hängt von ihrer Beschaffenheit ab und liegt für die in dieser Arbeit verwendeten thermostabilen Polymerase bei 72 °C. Auch die Zeit, die benötigt wird, um einen Einzelstrang komplett aufzufüllen, hängt von der Polymerase ab. Man rechnet bei der *Taq*-Polymerase mit etwa 1 min/kb. Diese Polymerase besitzt keine Fehlerkorrekturfunktion und so treten häufiger Mutationen auf als bei der *Pfu*-Polymerase, die eine solche Funktion besitzt. Diese ist mit etwa 2 min/kb halb so schnell wie die *Taq*-Polymerase. Pro Zyklus einer PCR entstehen aus jedem DNA-Doppelstrang zwei neue DNA Doppelstränge. Insgesamt entstehen in einer PCR mit n Zyklen also 2^n DNA-Doppelstränge aus jedem Ausgangsmolekül. Ein typischer Ablauf für eine PCR sieht wie folgt aus (siehe Tabelle 3.8):

Tabelle 3.8: Verlauf einer typischen Polymerase-Ketten-Reaktion.

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	5 min	
Denaturierung	95 °C	0,5-1 min	
Primeranlagerung	Schmelztemperatur	0,5-1 min	
Elongation	72 °C	1 min/kb (<i>Taq</i>) 2 min/kb (<i>Taq</i> und <i>Pfu</i>) 2 min/kb (<i>Pfu</i>)	35x
Finale Elongation	72 °C	5 min	
Lagerung	4 °C	∞	

Für eine PCR wurden stets 200 µl oder 500 µl Reaktionsgefäße (Sarstedt, Nümbrecht) verwendet und gestopfte Spitzen verwendet, um Kontaminationen der Reaktion mit Aerosolen aus der Pipette zu verhindern. Für jede PCR wurde stets eine Kontrolle mitgeführt, in der H₂O (PCR) an Stelle des „Templates“ verwendet wurde. Diese Ansätze wurden in einen Thermocycler (PTC-200 Peltier Thermal Cycler, MJ Research, Quebec, Kanada; PCR Robocycler Gradient 96, Agilent Technologies, Santa Clara, USA) gegeben, der die nötigen Temperaturphasen erzeugt, die im Verlauf der PCR für die Denaturierung, Primeranlagerung und Elongation benötigt werden. Um die benötigte Annealingtemperatur zu ermitteln, wurde für jedes Primerpaar eine Gradienten-PCR mit mehreren Temperaturschritten durchgeführt. Nach Ablauf der PCR wurde das Reaktionsgemisch auf 4 °C heruntergekühlt und entweder bei -20 °C gelagert oder direkt auf ein Agarosegel aufgetragen. Insgesamt wurden je nach Zweck drei Arten der PCR in dieser Arbeit durchgeführt. Zum einen wurde für rein analytische PCRs lediglich die *Taq*-Polymerase verwendet. Für Klonierungen mittels des „pEF6/V5-His TOPO® TA Expression Kit“s (siehe 3.2.2.8.1) und der Einführung von Punktmutationen mittels PCR (siehe 3.2.2.8.3.1) wurde ein Mix aus *Pfu*- und *Taq*-Polymerase verwendet. Für PCRs für eine Klonierung mit anschließender Restriktion (siehe 3.2.2.8.2) wurde eine PCR ausschließlich mit der *Pfu*-Polymerase durchgeführt. Eine Übersicht der Pipettierschemata ist in Tabelle 3.9 aufgeführt.

Eine weitere Variante der PCR ist die sogenannten „Colony“-PCR. Dabei werden als Template Bakterienkolonien einer LB-Agarplatte verwendet. Dazu wird die Bakterienkolonie mit einer sterilen Pipettenspitze zunächst auf eine neue LB-Agarplatte transferiert und diese bei 37 °C über Nacht inkubiert. Der Rest der Kolonie wird in 15 µl 10 mM Tris/HCl resuspendiert und 1 µl dieser Suspension direkt als Template einer PCR eingesetzt. Während des ersten

Denaturierungsschritt werden die Bakterien lysiert und ihre DNA freigesetzt, so dass sie als Template einer PCR dienen kann.

Tabelle 3.9: Pipettierschemata der verschiedenen Polymerase-Ketten-Reaktionen.

Komponente	Endkonzentration		
	<i>Taq</i>	<i>Pfu</i>	<i>Taq</i> und <i>Pfu</i>
DreamTaq™ Puffer	1×	-	-
Pfu Puffer mit MgSO₄	-	1×	1×
Forwärts-Primer	0,1-1 µM	0,1-1 µM	0,1-1 µM
Rückwärts-Primer	0,1-1 µM	0,1-1 µM	0,1-1 µM
dNTP Mix	800 µM (je 200 µM)	800 µM (je 200 µM)	800 µM (je 200 µM)
Betain	0,5 M	0,5 M	0,5 M
Template	5 pg-0,5 µg	5 pg-0,5 µg	5 pg-0,5 µg
DreamTaq	0,5 U	5 U	-
Pfu	-	0,5 U	0,5 U
H₂O (PCR)	ad 20 µl	ad 20 µl	ad 20 µl

3.2.2.5 Agarose-Gelelektrophorese

Um DNA-Fragmente der Größe nach aufzutrennen, eignet sich die Agarose-Gelelektrophorese. Dazu wurde Agarose (Carl Roth, Karlsruhe) in 1x TAE-Puffer aufgekocht, bis sich eine homogene Lösung gebildet hat. In dieser Arbeit wurden Gele mit 0,8-2 % (w/v) Agarose in TAE-Puffer verwendet. Anschließend wurde Ethidiumbromid mit einer finalen Konzentration von 0,5 µg/ml in das noch flüssige Agarosegel gegeben, alles zusammen in eine Gelkammer gegossen und mit einem Kamm versehen, der für die Ausbildung der Ladetaschen sorgte. Nach Aushärten des Gels wurde es in eine Laufkammer ((Wide) Mini-Sub® Cell GT System, Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) mit 1x TAE-Puffer überführt, die Proben mit DNA-Ladepuffer (Endkonzentration: 1×) (siehe 3.1.4.3) versehen und in die Taschen des Gels geladen. Zum Größenvergleich wurde eine Tasche mit 10 µL eines Größenmarker (siehe 3.1.4.3) beladen. Anschließend wurde eine konstante Spannung von 100 V angelegt. Durch die Spannung wandert die negativ geladene DNA zur Anode. Anhand des sich im Ladepuffer befindlichen Farbstoffs Orange G konnte der Fortschritt des Gellaufs beobachtet werden. Mittels UV-Bestrahlung konnte das mit der DNA interkalierte Ethidiumbromid sichtbar gemacht und dokumentiert werden (Geldokumentationsanlage und Software mit Videoprinter Modell P93DW; Intas Science Imaging Instruments, Göttingen; Mitsubishi, Otemachi, Japan). Für den Fall, dass die DNA-Fragmente noch für weitere Klonierungsschritte benötigt wurden, wurden diese mit einem frischen Skalpell aus dem

Agarosegel ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die DNA aus dem Gelstück wurde nach Herstellerangaben mit dem „NucleoSpin®Gel and PCR Clean-up“ Kit (Macherey-Nagel, Düren) extrahiert (siehe 3.2.2.6).

3.2.2.6 Aufreinigung von DNA mittels NucleoSpin®Gel and PCR Clean-up

Mit Hilfe des „NucleoSpin®Gel and PCR Clean-up“ Kits (Macherey-Nagel, Düren) kann DNA aus einem Agarosegel isoliert werden. Außerdem können damit große DNA Fragmente von Proteinen und kleinen DNA-Fragmenten getrennt werden. Dazu wurde das Kit nach Herstellerangaben verwendet, die DNA in H₂O (PCR) von der Säule eluiert und bei -20 °C gelagert.

3.2.2.7 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Um Plasmide auf Korrektheit zu überprüfen, wurden diese von der Firma LGC Genomics GmbH (Berlin) sequenziert. Die Plasmid-DNA wurde nach Firmenangaben verschickt. Zur Sequenzierung wurden entweder eigene Sequenzierprimer (siehe 3.1.9.3) nach Firmenangabe verwendet oder bei der Firma vorliegende Primer ausgewählt. Das Ergebnis der Sequenzierung konnte später über die Homepage der Firma abgerufen werden.

3.2.2.8 Klonierung

Noch nicht vorhandene Expressionsvektoren für bestimmte Proteine wurden für die Arbeit nach verschiedenen Methoden hergestellt.

3.2.2.8.1 Klonierung mit pEF6/V5-His TOPO® TA Expression Kit

Mit der Klonierung mit dem „pEF6/V5-His TOPO® TA Expression Kit“ (Invitrogen, Carlsbad, USA) kann in wenigen Schritten ein PCR-Amplikon der *Taq*-Polymerase in einen Expressionsvektor für Säugetierzellen kloniert werden. Die nicht-„Template“-abhängige Transferaseaktivität der *Taq*-Polymerase führt zu einem Anhängen eines einzelnen Desoxyadenosins an den beiden 3'-Enden ihres PCR-Produktes. Der mit dem Kit mitgelieferte Vektor liegt linearisiert vor und hat an seinen jeweiligen 3'-Enden ein freies Desoxythymidin, welches je mit einem freien Desoxyadenosin des PCR-Produktes hybridisieren kann. Der Vektor wird mit einer kovalent gebundenen Topoisomerase I aus dem *Vaccinia* Virus geliefert. Diese Bindung kann von der 5'-Hydroxylgruppe des PCR-Produktes angegriffen werden und liefert die Energie für eine Ligation der beiden DNA-Enden, wobei die Topoisomerase I von der DNA abgespalten wird (Shuman, 1994).

Die PCR zur Produktion des Amplikons wurde wie unter 3.2.2.4 beschrieben durchgeführt. Dazu wurde ein Gemisch aus *Taq*- und *Pfu*-Polymerase verwendet, um die Desoxyadenosin-Überhänge zu erhalten, aber dennoch eine relativ niedrige Mutationsrate zu erzielen. Die

Klonierung erfolgte nach Angaben des Herstellers mit anschließender Transformation in TOP10(F') Bakterien (siehe 3.2.2.1.2). Einzelklone wurden mit einer geeigneten Methode analysiert (siehe 3.2.2.3, 3.2.2.4 und 3.2.2.5) und positive Klone sequenziert (siehe 3.2.2.7). Nach erfolgreicher Sequenzierung wurden Kryostocks der Bakterien für spätere Verwendung angelegt (siehe 3.2.2.1.5) und Bakterien für eine Midi-Präparation vorbereitet (siehe 3.2.2.1.4).

3.2.2.8.2 Restriktion und Ligation

Eine andere Methode PCR-Produkte in Expressionsvektoren zu klonieren, beruht in der Einführung von Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen Typ II. Dazu werden Primer erstellt, die das zu amplifizierende DNA-Stück flankieren und zusätzlich an ihren 5'-Enden eine Erkennungssequenz für die jeweilige Restriktionsendonuklease tragen. Da die meisten Restriktionsenzyme ihre Sequenz besser erkennen, wenn diese nicht direkt am Rand der DNA sitzt, wurden noch einige Nukleotide am 5'-Ende angefügt. Die PCR wurde, wie unter 3.2.2.4 beschrieben, durchgeführt, das PCR-Produkt, wie unter 3.2.2.3 beschrieben, verdaut und, wie unter 3.2.2.6 beschrieben, aufgereinigt. Falls schon ein Plasmid mit dem gewünschten Insert vorlag und geeignete Schnittstellen besaß, konnte dieses Konstrukt ebenfalls wie unter 3.2.2.3 beschrieben verdaut werden. Der finale Vektor wurde ebenfalls mit den gleichen Enzymen geschnitten. Falls bei dem Verdau zwei große Fragmente entstanden, wurden diese über ein Agarosegel aufgetrennt und die gewünschte Bande ausgeschnitten (siehe 3.2.2.5) und aufgereinigt (siehe 3.2.2.6). Falls das nicht mehr benötigte Fragment kleiner als 50 bp war, konnte der Verdau direkt aufgereinigt werden (siehe 3.2.2.6). Die beiden Fragmente wurden mit der T4-DNA-Ligase nach Herstellerprotokoll ligiert und in TOP10- oder XL1 Blue-Bakterien transformiert (siehe 3.2.2.1.2). Für bessere Erfolgchancen wurden verschiedene Molekülverhältnisse von Vektor zu Insert getestet (1:3 und 1:7). Die einzusetzenden Mengen wurden anhand der photometrisch gemessenen Konzentration und folgender Formel errechnet.

Menge Insert [ng]

$$= \frac{\text{Menge Vektor [ng]} \times \text{Größe Insert [bp]}}{\text{Größe Vektor [bp]}} \times \text{Verhältnis(Insert: Vektor)}$$

Die Menge des eingesetzten Vektors blieb dabei konstant bei 100 ng. Die transformierten Bakterien wurden ausgestrichen, inkubiert und Einzelklone wurden mit einer geeigneten Methode analysiert (siehe 3.2.2.3, 3.2.2.4 und 3.2.2.5). Positive Klone wurden sequenziert (siehe 3.2.2.7). Nach erfolgreicher Sequenzierung wurden Kryostocks zur Lagerung der Bakterien angelegt (siehe 3.2.2.1.5) und Bakterien für eine Midi-Präparation vorbereitet (siehe 3.2.2.1.4).

3.2.2.8.3 Einführung von Punktmutationen

Gezielte Änderungen in der Aminosäuresequenz von Proteinen lassen sich gut zur Untersuchung der Funktion bestimmter Aminosäuren einsetzen. Solche Mutationen lassen sich in einen vorhandenen Expressionsvektor einbringen. Dazu wurden in dieser Arbeit zwei verschiedene Methoden verwendet.

3.2.2.8.3.1 Einführung von Punktmutationen mittels PCR

Ähnlich wie das Einführen von Schnittstellen können auch Punktmutationen mittels Primer während einer PCR eingeführt werden. In dieser Arbeit wurden vier Punktmutationen in insgesamt zwei Motiven in ein Konstrukt eingefügt. Dazu wurde zunächst je Motiv eine PCR mit dem Ausgangsplasmid durchgeführt. Als Primer für die erste PCR wurde ein „Forward“-Primer verwendet, der „upstream“ einer bereits vorhandenen Schnittstelle für ein Restriktionsenzym bindet und ein „Reverse“-Primer, der die ersten beiden Mutation einführt. Als Primer für die zweite PCR wurde ein „Forward“-Primer, der die zweiten beiden Mutation einführt, und ein „Reverse“-Primer, der an eine weiter „downstream“ liegende Schnittstelle für ein Restriktionsenzym bindet, verwendet. Die beiden PCR Produkte wurden auf ein Agarosegel aufgetragen (siehe 3.2.2.5) und nach einer Aufreinigung mittels „NucleoSpin®Gel and PCR Clean-up“ (siehe 3.2.2.6) als Primer für eine dritte PCR Reaktion eingesetzt. Zusätzlich wurden der „Forward“-Primer der ersten PCR und der „Reverse“-Primer der zweiten PCR hinzugefügt. Alle PCRs wurden mit einem Mix aus *Pfu*- und *Taq*-Polymerase (siehe 3.2.2.4) angesetzt. Das Produkt dieser dritten PCR wurde auf ein Agarosegel aufgetragen (siehe 3.2.2.5) und nach einer Aufreinigung mittels „NucleoSpin®Gel and PCR Clean-up“ (siehe 3.2.2.6), wie unter 3.2.2.8.2 beschrieben, weiter prozessiert. Nach der Sequenzierung zeigte sich, dass lediglich die ersten beiden Mutationen erfolgreich eingeführt wurden. Die zweite Mutation wurde daher wie unter 3.2.2.8.3.2 beschrieben eingeführt.

3.2.2.8.3.2 Einführung von Punktmutationen in Plasmid-DNA mittels QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit

Das QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit (Qiagen, Hilden) wurde zur Einführung von Punktmutationen nach Protokoll des Herstellers angewendet. Nach Beendigung der Mutagenesereaktion wurden TOP10 *E. coli* nach Protokoll (siehe 3.2.2.1.2) mit den Plasmiden transformiert und auf LB-Selektionsplatten ausplattiert. Von gewachsenen Klonen wurden Vorkulturen angeimpft und ihre Plasmid-DNA mittels Mini-Präparation isoliert (siehe 3.2.2.1.3). Die Korrektheit der Mutagenese wurde mittels Sequenzierung überprüft. Von positiven Klonen wurde ein Kryostock angelegt (siehe 3.2.2.1.5) und Midi-Präparation angefertigt (siehe 3.2.2.1.4).

3.2.2.8.4 Klonierungsstrategien

3.2.2.8.4.1 GLI1-S102/104/130/132A-EGFP

Um die Mutationen der Serine 102, 104, 130 und 132 zu Alaninen in den vorhandenen Vektor GLI1-EGFP einzubringen, wurde der entsprechende Abschnitt aus dem Plasmid GLI1-S102/104/130/132A-Flag mit den Enzymen BglII und XhoI herausgeschnitten, über ein Agarosegel vom restlichen Vektor getrennt (siehe 3.2.2.5) und mittels „NucleoSpin®Gel and PCR Clean-up“ (siehe 3.2.2.6) aufgereinigt. Das Plasmid GLI1-EGFP wurde ebenfalls mit BglII und XhoI verdaut und der Vektor ohne das für die Serine 102, 104, 130 und 132 codierende Stück mittels Agarosegelelektrophorese und „NucleoSpin®Gel and PCR Clean-up“ (siehe 3.2.2.5 und 3.2.2.6) aufgereinigt. Die beiden Fragmente wurden, wie unter 3.2.2.8.2 beschrieben, ligiert und in TOP10 Bakterien transformiert.

3.2.2.8.4.2 GLI1-S102/104D-130/132D-EGFP

Das Konstrukt GLI1-102/104D-130/132D-EGFP wurde, wie unter 3.2.2.8.3.1 und 3.2.2.8.3.2 beschrieben, hergestellt. Dazu wurde mit dem Primerpaaren GLI1mim-1 und GLI1mim-2 (siehe 3.1.9.4) sowie den Paaren GLI1mim-3 und GLI1mim-4 (siehe 3.1.9.4) zunächst je eine PCR mit GLI1-S102/104/130/132A-Flag als Template durchgeführt. Die beiden Amplikons wurden dann als Primer für eine erneute PCR mit GLI1-S102/104/130/132A-Flag als „Template“ eingesetzt. Das PCR Produkt wurde, wie unter 3.2.2.8.2 beschrieben, mit BglII und XhoI verdaut und analog zu 3.2.2.8.4.1 in das Plasmid GLI1-EGFP kloniert. Da über diesen Weg nur zwei (S102/104D) der vier gewünschten Mutationen eingeführt werden konnten, wurden die dritte und vierte Mutation (S130/132D), wie unter 3.2.2.8.3.2 beschrieben, mit den Primern GLI1mim-3 und GLI1mim-5 eingeführt.

3.2.2.8.4.3 pEF-DYRK2

Die codierende Sequenz von DYRK2 wurde mittels den Primern hDYRK2_For und hDYRK2_Rev (siehe 3.1.9.4) mit einem Gemisch aus *Taq*- und *Pfu*-Polymerase aus dem Vektor CMV-DYRK2 amplifiziert (erwartetes Amplikon: 1,6 kb; PCR-Programm siehe Tabelle 3.10). Das PCR-Produkt wurde auf ein Agarosegel aufgetragen (siehe 3.2.2.5) und, wie unter 3.2.2.6 beschrieben, aufgereinigt. Anschließend wurde das Amplikon, wie unter 3.2.2.8.1 beschrieben, in den pEF6/V5-His Vektor kloniert.

Tabelle 3.10: PCR Programm zu Klonierung von pEF-DYRK2.

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	5 min	
Denaturierung	95 °C	45 s	
Primeranlagerung	60 °C/62 °C/64 °C	45 s	35×
Elongation	72 °C	4 min	
Finale Elongation	72 °C	5 min	
Lagerung	4 °C	∞	

3.2.2.8.4.4 pEF-DYRK3

Die codierende Sequenz von DYRK3B wurde mittels den Primern hDYRK3b_For und hDYRK3_Rev (siehe 3.1.9.4) mit einem Gemisch aus *Taq*- und *Pfu*-Polymerase aus dem Vektor EGFP-DYRK3 amplifiziert (erwartetes Amplikon: 1,7 kb; PCR-Programm siehe Tabelle 3.11). Das PCR-Produkt wurde auf ein Agarosegel aufgetragen (siehe 3.2.2.5) und, wie unter 3.2.2.6 beschrieben, aufgereingt. Anschließend wurde das Amplikon, wie unter 3.2.2.8.1 beschrieben, in den pEF6/V5-His Vektor kloniert.

Tabelle 3.11: PCR Programm zu Klonierung von pEF-DYRK3.

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	5 min	
Denaturierung	95 °C	45 s	
Primeranlagerung	52 °C/54 °C/56 °C/ 58 °C	45 s	35×
Elongation	72 °C	4 min	
Finale Elongation	72 °C	5 min	
Lagerung	4 °C	∞	

3.2.2.8.4.5 pEF-DYRK4

Die codierende Sequenz von DYRK4 wurde mittels den Primern hDYRK4_For und hDYRK4_Rev (siehe 3.1.9.4) mit einem Gemisch aus *Taq*- und *Pfu*-Polymerase aus dem Vektor HA-DYRK4 amplifiziert (erwartetes Amplikon: 1,56 kb; PCR-Programm siehe Tabelle 3.12). Das PCR-Produkt wurde auf ein Agarosegel aufgetragen (siehe 3.2.2.5) und, wie unter 3.2.2.6 beschrieben, aufgereingt. Anschließend wurde das Amplikon, wie unter 3.2.2.8.1 beschrieben, in den pEF6/V5-His Vektor kloniert.

Tabelle 3.12: PCR Programm zu Klonierung von pEF-DYRK4.

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	5 min	
Denaturierung	95 °C	45 s	
Primeranlagerung	54 °C/56 °C/ 58 °C/60 °C	45 s	35×
Elongation	72 °C	4 min	
Finale Elongation	72 °C	5 min	
Lagerung	4 °C	∞	

3.2.2.9 Analyse von Transkripten eukaryotischer Zellen

3.2.2.9.1 Isolation der gesamten RNA eukaryotischer Zellen

RNA ist ein relativ instabiles Molekül, da die Hydroxygruppe an der 2'-Position der Ribose hydrolysiert werden kann. Außerdem wird sie durch RNasen, die sich in allen lebenden Zellen und auf vielen Oberflächen, wie Labormaterialien, befinden, effizient abgebaut. Deswegen ist beim Arbeiten mit RNA extreme Vorsicht geboten. Aus diesem Grund wurden für die Isolation der RNA aus eukaryotischen Zellen stets frische, RNase-freie Verbrauchsmaterialien verwendet. Die Isolation erfolgte nach Herstellerangaben mit dem „NucleoSpin® RNA II“ (Macherey-Nagel, Düren) Kit. Die RNA wird dabei an eine Silica-Gel Matrix gebunden. Zum Schutz der RNA vor Degradation während der Isolation sind im Lyse- und Waschpuffer chaotrope Ionen, wie zum Beispiel Guanidin-Thiocyanat, enthalten. Diese inhibieren RNasen. Durch die Behandlung der Silica-Gel Matrix mit rekombinanter RNase-freier DNase (rDNase), wird ebenfalls an die Matrix gebundene genomische DNA entfernt. Nach der Elution der RNA in H₂O (RNase-frei, aus Kit), wurde die Konzentration der RNA photometrisch bestimmt (siehe 3.2.2.2) und diese bei -20 °C gelagert.

3.2.2.9.2 Reverse Transkription der RNA in cDNA

Da RNA sich chemisch von DNA unterscheidet und nicht direkt als Template einer PCR verwendet werden kann, muss sie mittels einer reversen Transkriptase, einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, in DNA, die sogenannte komplementäre DNA (cDNA), umgeschrieben werden. Dies geschah entweder unter Verwendung des „Omniscript™ 200 RT“ (Qiagen, Hilden) Kits oder mit dem „iScript™ cDNA Synthesis Kit“ (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) nach Herstellerangaben.

3.2.2.9.2.1 Reverse Transkription mit Omniscript™ RT 200

Die Synthese der cDNA mittels „Omniscript™ RT 200“ (Qiagen, Hilden) geschah nach Herstellerangaben. Der verwendete Oligo-dT-Primer bindet an den Poly-A-Schwanz der mRNA.

So wird mit diesem Kit nur mRNA amplifiziert. Für jedes Experiment wurde die maximal mögliche RNA-Menge der am niedrigsten konzentrierten Probe errechnet und diese Menge an RNA von jeder Probe in cDNA umgeschrieben. Ein Pipettierschema einer typischen Reaktion zeigt Tabelle 3.13. Die Reaktion wurde 1 h bei 37 °C inkubiert und anschließend mit 36 µl H₂O (PCR) verdünnt. Die entstandene cDNA wurde entweder direkt als Template einer qPCR eingesetzt oder bei -20 °C gelagert.

Tabelle 3.13: Pipettierschema der cDNA-Synthese mit Omniscript™ RT200.

Komponente	Endkonzentration
RT-Puffer	1×
dNTPs	0,5 mM (4× 0,125 mM)
Oligo-dT-Primer	1 µM
RNase Inhibitor	2,5 U
Reverse Transkriptase	4 U
RNA	maximal 1 µg
H₂O (RNase-frei, aus Kit)	ad 20 µl

3.2.2.9.2.2 Reverse Transkription mit iScript™ cDNA Synthesis Kit

Die Synthese der cDNA mittels „iScript™ cDNA Synthesis Kit“ (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) geschah nach Herstellerangaben. Der fertige Mix enthält sowohl Oligo-dT-Primer als auch Primer aus zufälligen Hexameren, um eine komplette reverse Transkription der mRNA zu gewährleisten. Für jedes Experiment wurde die maximal mögliche RNA-Menge der am niedrigsten konzentrierten Probe errechnet und diese Menge an RNA – höchstens jedoch 1 µg – von jeder Probe in cDNA umgeschrieben. Ein Pipettierschema einer typischen Reaktion zeigt Tabelle 3.14. Die Reaktion wurde nach Herstellerangaben in einem Thermocycler (PTC-200 Peltier Thermal Cycler, MJ Research, Quebec, Kanada) inkubiert (siehe Tabelle 3.15) und anschließend mit 40 µl H₂O (PCR) verdünnt. Die entstandene cDNA wurde entweder direkt als Template einer qPCR eingesetzt oder bei -20 °C gelagert.

Tabelle 3.14: Pipettierschema der cDNA-Synthese mit iScript™ cDNA Synthesis Kit.

Komponente	Endkonzentration
iScript™ Reaktionsmix	1×
iScript™ Reverse Transkriptase	1 µl
RNA	maximal 1 µg
H₂O (RNase-frei, aus Kit)	ad 20 µl

Tabelle 3.15: Temperaturprogramm der cDNA-Synthese mit iScript™ cDNA Synthesis Kit.

Zeit	Temperatur
5 min	25 °C
30 min	42 °C
5 min	85 °C
∞	4 °C

3.2.2.9.3 Analyse der cDNA-Mengen mittels quantitativer Echtzeit-PCR (qPCR)

Das Endresultat einer PCR kann nicht ohne weiteres quantifiziert werden, da eine PCR nach einigen Zyklen in eine Sättigung gerät und keine weiteren DNA-Doppelstränge mehr synthetisiert werden. Um also über eine PCR Rückschlüsse auf die Mengen im Ausgangsmaterial zu erhalten, muss die entstandene DNA-Menge in Echtzeit beobachtet werden. Dazu wurde in dieser Arbeit der Farbstoff SYBR-Green I verwendet. Dieser Farbstoff interkaliert mit doppelsträngiger DNA und bildet einen Komplex, der Licht der Wellenlänge von 494 nm absorbiert und Licht der Wellenlänge 521 nm emittiert (Schneeberger et al., 1995). Über die Intensität der Fluoreszenz kann die aktuelle Menge an Doppelsträngiger DNA gemessen werden. Um die Proben miteinander zu vergleichen, wird die Fluoreszenzintensität am Ende jedes Zyklus gemessen. Nach dem Lauf wird eine Intensität festgelegt, bei der sich alle Reaktionen in der linearen Phase befinden, und ermittelt, in welchem Zyklus die jeweilige Probe diese Schwelle erreicht hat. Diesen Wert bezeichnet man als Ct-Wert (cycle threshold). Als Kontrolle für gleiche RNA-Mengen wurde stets das Haushaltsgen *PO* als Kontrolle mitgemessen. Die relativen Transkriptmengen werden über folgende Formel errechnet:

$$\Delta Ct = Ct_{Gen} - Ct_{Haushaltsgen}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{Probe} - \Delta Ct_{Kontrolle}$$

$$relative\ Transkriptmenge = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Die Spezifität der PCR wurde mittels einer Schmelzkurve sichergestellt. Dazu wurde nach dem letzten Zyklus der PCR die Reaktion schrittweise von 65 °C auf 95 °C erhitzt, um die DNA-Stränge voneinander zu trennen. Der Verlauf der Fluoreszenz während des Aufheizens wurde gemessen. Bei einem spezifischen Produkt verringert sich die Fluoreszenz so, dass die negative Ableitung der Fluoreszenzintensität nach der Zeit nur ein lokales Maximum besitzt.

Für die qPCR Reaktion wurde der Fertigmix „Absolute™ QPCR SYBR® Green Mix“ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) verwendet. Ein typischer qPCR-Reaktionsansatz ist Tabelle 3.16 zu entnehmen. Die qPCR-Reaktion inklusive der Fluoreszenzmessung wurde mittels des MX3000P

oder MX3005P QPCR-Systems (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) durchgeführt. Die Betriebssoftware des Gerätes errechnete die zu verwendende Schwelle und dem zugehörigen Ct-Wert. Das verwendete Temperaturprofil kann aus Tabelle 3.17 und Abbildung 3.1 entnommen werden.

Tabelle 3.16: Pipettierschema einer qPCR.

Komponente	Endkonzentration
ABsolute™ QPCR SYBR® Green Mix	1×
Forward Primer	0,2 µM
Reverse Primer	0,2 µM
cDNA	1 µl
H₂O (PCR)	ad 20 µl

Tabelle 3.17: Temperaturschema einer qPCR.

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen	Messung der Fluoreszenz
Initiale Denaturierung und Enzymaktivierung	95 °C	15 min		-
Denaturierung	95 °C	15 s		-
Primeranlagerung	Schmelztemperatur	20 s	40×	Am Endpunkt der Primeranlagerung
Elongation	72 °C	15 s		-
Schmelzkurve	Schmelztemperatur- 95 °C	-		Während des Aufheizens

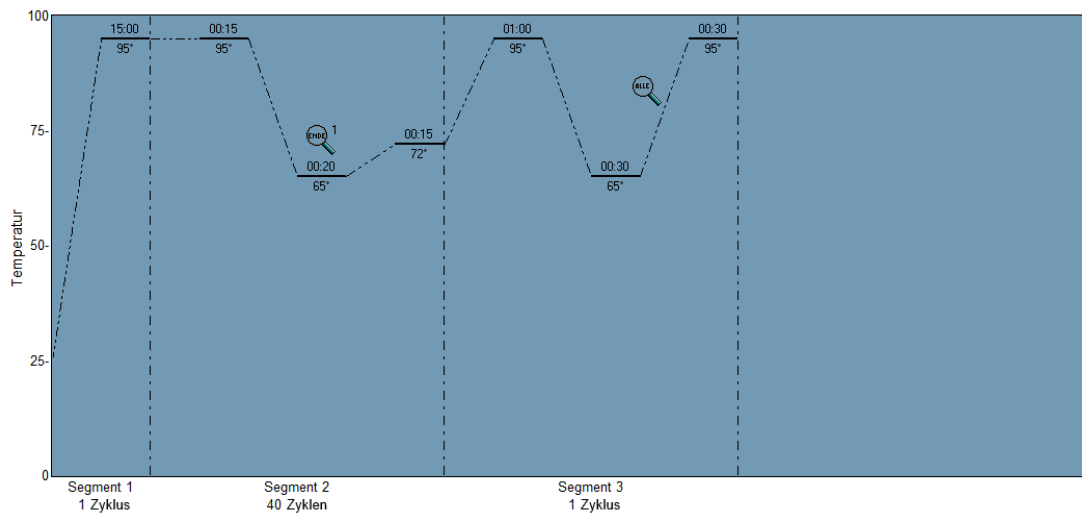


Abbildung 3.1: Thermales Profil einer qPCR mit einer Schmelztemperatur von 65 °C. In Segment 1 wird die Polymerase durch 15 min bei 95 °C aktiviert. Segment 2 beinhaltet die Amplifikation des spezifischen cDNA Abschnittes und in Segment 3 wird mittels einer Schmelzkurve die Spezifität der PCR überprüft.

3.2.3 Proteinbiochemische Methoden

3.2.3.1 Reportergerne messung

Mittels der Reportergerne-Analyse lassen sich mit einfachen Mitteln Effekte von verschiedenen Faktoren auf die Promotoraktivität verschiedener Gene untersuchen. Dazu wird der zu untersuchende Promotor vor ein sogenanntes Reportergerne kloniert. Die Menge des aus diesem Reportergerne exprimierten Proteins lässt sich über unterschiedliche Methoden detektieren und so lassen sich Rückschlüsse über die Aktivität des Promotors ziehen. In dieser Arbeit wurden dazu bereits vorhandene Konstrukte mit dem *Luziferase*-Gen aus *Photinus pyralis* hinter dem zu untersuchenden Promotor verwendet. Um Effekte durch unterschiedliche Transfektionseffizienzen zu verhindern, wurde immer ein Konstrukt mit einem anderen Reportergerne (*Luziferase* aus *Renilla reniformis*, *LacZ*) unter der Kontrolle eines konstitutiv aktiven Promotors (SV40 (Simian-Virus 40), TK (Promotor der Thymidinkinase)) kotransfiziert. Die Transfektion geschah wie unter 3.2.1.4.1 beschrieben. Falls die Zellen nach der Transfektion ohne weitere Behandlung lysiert wurden, wurde mit PEI (siehe 3.2.1.4.1.1) transfiziert, falls noch eine weitere Stimulation erfolgte (siehe 3.2.1.5), wurde X-tremeGENE HP (siehe 3.2.1.4.1.2) als Transfektionsreagenz gewählt. Nach der Transfektion wurden die Zellen nach der entsprechenden Zeit lysiert. Dazu wurden die Zellen einmal in PBS gewaschen und anschließend die entsprechende Menge (siehe Tabelle 3.18) „Passive Lysis Buffer“ (Promega, Fitchburg, USA), „Lysis-Juice 1“ (Pjk, Kleinblittersdorf; nur bei Normalisierung mit *LacZ*) oder „Lysis-Juice 2“ (Pjk, Kleinblittersdorf; nur bei Normalisierung mit *Luziferase* aus *Renilla reniformis*) auf die Zellen pipettiert und die Zellen 20 min bei Raumtemperatur und 100 rpm geschüttelt. Falls die Zellen mit „Passive Lysis Buffer“ oder „Lysis-Juice 1“ lysiert wurden, konnten die unterschiedlichen Proteine der Reportergerne direkt gemessen werden, oder die lysierten Zellen für einige Tage

bei -80 °C gelagert werden. Für den Fall, dass „Lysis-Juice 2“ zur Lyse verwendet wurde, war ein Einfrierschritt bei -80 °C obligatorisch. Von dem Zelllysate wurden je nach Zelltyp je 10-20 µl für die Messung verwendet. Die Messung erfolgte in Duplikaten für jedes Reportergen. Die Aktivität der Luziferase aus *Photinus pyralis* wurde mit „Beetle-Juice“ (Pjk, Kleinblittersdorf) gemessen. Dazu wurden mittels des Luminometers (OrionL Microplate Luminometer, Berthold Detection Systems, Pforzheim) 50 µl der nach Herstellerangaben rekonstituierten Lösung (siehe 3.1.4.4) auf die Zellen gegeben und nach 2 s Wartezeit die Lichtemission 5 s lang gemessen. Die Messung der Aktivität der Luziferase aus *Renilla reniformis* erfolgte mittels „Renilla-Juice“ (Pjk, Kleinblittersdorf). Dazu musste das nach Herstellerangaben rekonstituierte Coelenterazin 1:50 in „Renilla-Juice“ verdünnt werden. Die Messung selbst erfolgte analog zu der Messung mit „Beetle-Juice“ allerdings in getrennten Vertiefungen. Die Messung der βGalaktosidase-Aktivität – dem Genprodukt des *LacZ*-Gens – wurde mit „β-Gal-Juice PLUS“ (Pjk, Kleinblittersdorf) nach Herstellerangaben über Chemilumineszenz gemessen. Dazu wurde auf die entsprechende Menge Lysat 50 µl „β-Gal-Juice PLUS“ pipettiert und nach einer Inkubation von 30-60 min 50 µl „Triggering Reagent“ zugegeben und durch Schütteln gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 2-10 min wurde die Lichtemission mittels des Luminometer (OrionL Microplate Luminometer, Berthold Detection Systems, Pforzheim) für 1 s gemessen. Wenn die Zellen direkt in 96-well Platten für die Luziferasemessung (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) ausgesät und lysiert wurden, wurden 2/3 des Gesamtvolumens mit „Beetle-Juice“ und 1/3 des Gesamtvolumens mit „Renilla-Juice“ gemessen. Die gemessenen Lichtemissionen wurden von dem Programm Simplicity (Version 4.2, Berthold Detection Systems, Pforzheim) als absolute Zahlenwerte ausgegeben. Um die relativen Luziferaseeinheiten zu errechnen, wurden die absoluten Zahlenwerte der Messung der Luziferase aus *Photinus pyralis* in Relation zu denen der Messung der Luziferase aus *Renilla reniformis* oder der βGalaktosidase gesetzt:

$$\text{relative Luziferaseeinheiten} = \frac{\text{absolute Lichtmenge (Luziferase}_{\text{Photinus pyralis}})}{\text{absolute Lichtmenge (Luziferase}_{\text{Renilla reniformis}})}$$

oder

$$\text{relative Luziferaseeinheiten} = \frac{\text{absolute Lichtmenge (Luziferase}_{\text{Photinus pyralis}})}{\text{absolute Lichtmenge (βGalaktosidase)}}$$

Tabelle 3.18: Verwendete Volumina an Lysepuffer.

Zellkulturformat	Volumen an Lysepuffer
96 well	30 µl
24 well	100 µl
12 well	200 µl

3.2.3.2 Präparation von Gesamtzellextrakten

Zur Analyse von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (siehe 3.2.3.5) wurden Zellen im benötigten Format ausgesät und entsprechend behandelt. Um Gesamtzellextrakte herzustellen, wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend in der entsprechenden Menge 1× SDS-Probenpuffer (siehe 3.1.4.4; mit oder ohne Bromphenolblau) aufgenommen und von der Zellkulturschale gelöst. Das Lysat wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 95 °C aufgekocht, um alle Proteine komplett zu denaturieren.

3.2.3.3 Proteinbestimmung mittels Pierce® 660nm Protein Assay

Die Proteinkonzentrationen von Lysaten mit höheren Mengen an Detergenzien können nicht mit der klassischen Methode nach Bradford bestimmt werden (Bradford, 1976). Daher wurde der „Pierce® 660nm Protein Assay“ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) in Kombination mit dem „Ionic Detergent Compatibility Reagent“ (IDCR, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) nach Herstellerangaben verwendet, um die relativen Proteinkonzentrationen zu bestimmen und anzugleichen.

3.2.3.4 Immunpräzipitation

Mit der Immunpräzipitation (IP) kann man verschiedene Proteine anreichern oder Protein-Protein-Interaktion mittels einer Co-IP nachweisen. Die Fc-Region der zugegebenen Antikörper bindet an das an Sepharosematrix gekoppelte Protein A oder Protein G (Elion, 2006; Masters, 2004). So kann der Komplex Matrix-Antikörper-Protein aus einem Lysat präzipitiert werden.

Für die IP wurde zunächst die Protein A- oder Protein G-Sepharose (siehe 3.1.4.4) vorbereitet. Dazu wurde der komplette Inhalt der Flasche, in der die Sepharose geliefert wurde, mit PBS Dulbecco (Invitrogen, Carlsbad, USA) vermischt und zwar mit dem Zehnfachen des Ausgangsvolumens. Dieses Gemisch wurde über Nacht bei 4 °C inkubiert und anschließend für 5 min bei 1500 rpm ($\Delta 478 \times g$) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Sepharose erneut in dem gleichen Volumen (das Zehnfache des Ausgangsvolumens) PBS Dulbecco (Invitrogen, Carlsbad, USA) aufgenommen, gemischt, erneut für 5 min bei 1500 rpm ($\Delta 478 \times g$) zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Dieser Vorgang wurde nochmals

wiederholt, die Sepharose anschließend in dem gleichen Volumen (das Zehnfache des Ausgangsvolumens) PBS Dulbecco (Invitrogen, Carlsbad, USA) mit 10 % NaN_3 aufgenommen und bei 4 °C gelagert. Die so erhaltenen Protein A- und Protein G-Suspensionen wurden für die IP zu gleichen Teilen miteinander vermischt.

Für die IP wurden Zellen in 10 cm Schalen ausgesät und wie gewünscht behandelt. Zur Herstellung von Proteinlysaten für die IP wurden die Zellen auf Eis gestellt und mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml IPH-Puffer (mit 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 50 µg/ml Aprotinin, 50 µg/ml Leupeptin) mit einem Zellschaber von der Zellkulturschale gekratzt und in ein Reaktionsgefäß überführt. Das entstandene Lysat wurde mit einer 1 ml Spritze (BD Medical, Franklin Lakes, USA) mehrmals durch eine Kanüle (0,8 mm × 40 mm, BD Medical, Franklin Lakes, USA) gezogen und so homogenisiert. Nach einer Inkubation für 10 min auf Eis wurden die Proben bei $10.000 \times g$ und 4 °C für 10 min zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Diese Ansätze wurden nun optional einem „Preclearing“ unterzogen, um unspezifisch an die Sepharosematrix bindende Proteine zu entfernen, oder direkt weiterverwendet. Für das „Preclearing“ wurden 20 µl des wie oben beschrieben vorbereiteten Gemisches aus Protein A- und Protein G-Sepharose auf die Proben gegeben und diese Ansätze für 1 h bei 4 °C auf dem Rotator (Revolver Rotator; Labnet, Woodbridge, USA) inkubiert. Nach einer Zentrifugation für 1 min bei $10.000 \times g$ wurde der Überstand weiterverwendet.

Von den so gewonnenen Lysaten wurden 50-100 µl abgenommen, mit der entsprechenden Menge 5× SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95 °C aufgeköcht. Diese „Input“-Kontrollen wurden bei -20 °C gelagert. Der Rest wurde mit der entsprechenden Menge des jeweiligen Antikörpers (siehe 3.1.6.1) und 40 µl des Gemisches aus Protein A- und Protein G-Sepharose versetzt und über Nacht bei 4 °C auf dem Rotator (Revolver Rotator; Labnet, Woodbridge, USA) inkubiert. Danach wurde die Sepharosematrix bei 4 °C und $10.000 \times g$ für 2 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, die Matrix wurde in 1 ml IPH-Puffer mit Inhibitoren resuspendiert und erneut für 1 min bei 4 °C und $10.000 \times g$ zentrifugiert, um ungebundene und schwach gebundene Proteine zu entfernen. Nach Abnehmen des Überstandes wurde dieser Waschschrift dreimal wiederholt. Beim letzten Abnehmen wurde der Überstand komplett abgenommen und die Sepharosematrix in 35 µl 1× SDS-Probenpuffer resuspendiert. Die in Probenpuffer resuspendierte Matrix wurde für 5 min bei 95 °C aufgeköcht, um die gebundenen Proteine zu denaturieren und von der Matrix zu lösen. Die Proben der IP wurden entweder direkt zusammen mit den vor der IP entnommenen „Input“-Kontrollen auf ein Acrylamidgel aufgetragen oder ebenfalls bei -20 °C gelagert.

3.2.3.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Im Gegensatz zu DNA sind Proteinmoleküle nicht entsprechend ihres Molekulargewichts geladen. Um sie dennoch im elektrischen Feld auftrennen zu können, verwendet man das Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS). Dieses negativ geladene Molekül bindet Proteine und maskiert zusätzlich ihre Eigenladung. Alle Proteinauftrennungen wurden mittels einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt. Dazu wurde nach Zugabe von Ammoniumpersulfat (APS) und Tetramethylethyldiamin (TEMED) das Trenngel mit der entsprechenden Acrylamidkonzentration (siehe 3.1.4.4) in die vorbereiteten Glasplatten gegossen und mit 2-Propanol überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren wurde das 2-Propanol abgegossen. Das Sammelgel (siehe 3.1.4.4) wurde ebenfalls mit APS und TEMED versetzt, auf das Trenngel gegossen und ein Kamm je nach benötigter Anzahl an Geltaschen in das Sammelgel eingeführt. Nach dessen Auspolymerisieren wurde das Gel in eine Laufkammer gesetzt und diese mit 1× SDS-Laufpuffer (siehe 3.1.4.4) gefüllt. Die Kämme wurden entfernt und die Taschen mit 1× SDS-Laufpuffer ausgespült.

Die entsprechende Menge der Proteinextrakte wurde in die Taschen des Gels geladen. Zusätzlich wurde als Größenmarker der PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) aufgetragen. Die Proben wurden bei 10 mA pro verwendetem Gel einlaufen gelassen, bis die Lauffront das Trenngel erreicht hatte. Danach wurden die Proteine bei 30 mA pro Gel laufen gelassen, bis die Lauffront das Ende des Gels erreicht hatte.

3.2.3.6 Fraktionierung von G-AKTIN und F-AKTIN

Das Verhältnis von globulärem, also monomerem, AKTIN (G-AKTIN) zu filamentärem, also polymerisiertem AKTIN (F-AKTIN) wird durch viele Einflüsse gesteuert und hat Auswirkungen auf verschiedene nachfolgende Faktoren, wie etwa Transkription von Genen. Eine Methode dieses Verhältnis zu bestimmen ist die Fraktionierung dieser beiden Zustände und einer anschließenden Analyse mittels Westernblot. Die Fraktionierung geschah nach dem Protokoll des „G-actin / F-actin In Vivo Assay Kit“ (Version 1.1 und 3.5, Cytoskeleton, Inc., Denver, USA). Für die Fraktionierung wurden Zellen in dem gewünschten Format ausgesät und behandelt. Nach dieser Behandlung wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit der entsprechenden Menge (siehe Tabelle 3.19) 37 °C-warmen LAS-Puffer (siehe 3.1.4.4) von der Zellkulturschale mit einem Zellschaber abgekratzt und in ein Reaktionsgefäß überführt. Das Lysat wurde durch mehrmaliges pipettieren mit einer 200 µl-Pipettenspitze homogenisiert und anschließend für 10 min bei 37 °C inkubiert. Nach einer Zentrifugation von 5 min bei 350 × g und Raumtemperatur, um Zelldebris und noch intakte Zellen zu pelletieren, wurden 100 µl Lysat entnommen und mit 25 µl 5× SDS-Probenpuffer für 5 min bei 95 °C aufgeköcht. Weitere 100 µl wurden von dem zentrifugierten Lysat entnommen und in Ultrazentrifugationsreaktionsgefäße (Microfuge Tube,

Beckmann, München) überführt. Diese wurden 1 h bei $100.000 \times g$ zentrifugiert, um F-AKTIN zu pelletieren. Der Überstand mit dem darin enthaltenen G-AKTIN wurde entnommen und mit $25 \mu\text{l}$ $5\times$ SDS-Probenpuffer für 5 min bei 95°C aufgeköcht. Auf das F-AKTIN-Pellet wurden $100 \mu\text{l}$ 8 M Urea gegeben und 1 h auf Eis inkubiert, um das F-AKTIN zu depolymerisieren. Währenddessen wurden die Proben alle 15 min gemischt. Um die Proben für die SDS-PAGE vorzubereiten, wurden $25 \mu\text{l}$ $5\times$ SDS-Probenpuffer zugegeben und 5 min bei 95°C aufgeköcht. Die Proben wurden entweder direkt auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen oder bei -20°C gelagert.

Tabelle 3.19: Volumina an LAS für die Fraktionierung von G-AKTIN und F-AKTIN.

Zellkulturformat	Volumen an LAS
6 cm	250 μl
10 cm	500 μl

3.2.3.7 Westernblot

Zum Nachweis der aufgetrennten Proteine mittels Westernblot (Immunblot) wurden die Proteine aus den SDS-Polyacrylamid-Gelen über das Tank-Blotting-Verfahren auf eine PVDF-Membran übertragen. Dazu wurde zunächst die zugeschnittene Membran in Methanol äquilibriert und anschließend in H_2O (reinst) gewaschen. Danach wurden die Membranen in $1\times$ Blotpuffer (siehe 3.1.4.4) zwischengelagert. Die benötigten Schwämme wurden ebenfalls in $1\times$ Blotpuffer getaucht. Die Kassetten für das Tank-Blotting wurden wie folgt beladen: Kathodenseite der Kassette, Schwamm, $2\times$ Whatman-Filter, SDS-Polyacrylamid-Gel, PVDF-Membran, $2\times$ Whatman-Filter, Schwamm, Anodenseite der Kassette. Der Proteintransfer erfolgte bei 350 mA pro Blotting-Kammer für 1 h. Nach Beendigung des Proteintransfers wurde die Membran kurz in TBS-T gewaschen und dann für 1 h bei Raumtemperatur in 5 % Milchpulver in TBS-T blockiert. Danach wurde der Primärantikörper (siehe 3.1.6.1) in der entsprechenden Konzentration in 5 % Milchpulver beziehungsweise 5% BSA in TBS-T verdünnt und über Nacht bei 4°C auf der Membran inkubiert. Danach wurde die Membran dreimal für je 10 min in TBS-T gewaschen und anschließend der Sekundärantikörper (siehe 3.1.6.2) in 5 % Milchpulver in TBS-T für eine Stunde bei Raumtemperatur auf der Membran inkubiert. Nach Ablauf der Stunde wurde die Membran erneut dreimal für je 10 min in TBS-T gewaschen und anschließend nach Herstellerangaben mit einer kommerziell erhältlichen Chemilumineszenz-Lösung (siehe 3.1.4.4) inkubiert. In einer Röntgenfilmkassette wurden Röntgenfilme für unterschiedliche Zeitspannen durch die ECL-Reaktion belichtet und schließlich in einer Entwicklermaschine (Filmentwickler Kodak X-Omat 2000 Processor; Kodak, Rochester USA) entwickelt.

Die entstandenen Banden konnten mittels der Software GelQuant.Net (<http://biochemlabsolutions.com/>) quantifiziert werden.

3.2.4 Fluoreszenzmikroskopie

Bestimmte Moleküle, sogenannte Fluorophore, können Licht einer bestimmten Wellenlänge absorbieren und werden so dazu angeregt, Licht in einer anderen Wellenlänge zu emittieren. Die Wellenlänge des emittierten Lichtes ist dabei stets höher, also energieärmer, als die des absorbierten Lichts (Coling und Kachar, 2001). Dies macht man sich zu Nutze, um Proteine in intakten Zellen zu lokalisieren. Da Proteine, außer einige wenige Ausnahmen, wie etwa das grün-fluoreszierende Protein (GFP), diese Fähigkeit nicht besitzen, müssen sie mit solchen Fluorophoren gekoppelt werden. In dieser Arbeit wurden dafür verschiedene Methoden angewandt. Zum einen können Proteine mit dem oben genannten GFP oder anderen fluoreszierenden Proteinen fusioniert werden, indem sie mit der codierenden Sequenz eines solchen Proteins in einen Expressionsvektor kloniert werden. Auch der Nachweis von Proteinen mit spezifischen Primärantikörpern und mit Fluorophoren gekoppelten Sekundärantikörpern ist möglich. Zum Anfärben des Aktinzytoskeletts macht man sich Phalloidin, eine Komponente des Giftes des grünen Knollenblätterpilzes (*Amanita phalloides*), zunutze. Phalloidin gehört zur Gruppe der Phallotoxine und bindet mit hoher Affinität an F-AKTIN (Cooper, 1987). Dieses Phalloidin ist kommerziell mit verschiedenen gebundenen Fluorophoren (hier Texas Red oder California Red) erhältlich.

3.2.4.1 Ätzen von Deckgläschen

Für die Fluoreszenzmikroskopie werden die zu untersuchenden Zellen auf Deckgläschen aus Glas ausgesät. Die Oberfläche der Deckgläschen wurde mittels eines Gemisches aus Ethanol und Salzsäure angeraut, um den Zellen einen besseren Untergrund zum Anheften zu geben. Die Deckgläschen wurden dazu für 1-2 h in 1 % HCl und 70 % Ethanol in H₂O (reinst) auf einem Kreisschüttler inkubiert und anschließend dreimal mit H₂O (reinst) gewaschen und getrocknet. Zur Sterilisation wurden sie für mindestens 4 h bei 175 °C erhitzt.

3.2.4.2 Vorbereiten der Zellen für die Fluoreszenzmikroskopie

Zellen wurden, falls nötig, zuerst wie unter 3.2.1.4.1.2 beschrieben mit X-tremeGENE HP transfiziert und einen Tag später in ein 24 well mit einem Deckgläschen umgesetzt. Zellen, die nicht transfiziert wurden, wurden direkt in ein 24 well mit einem Deckgläschen ausgesät. Nach gewünschter Behandlung der Zellen wurden diese mit PBS gewaschen und anschließend in 4 % Formaldehyd in PBS 10 min lang bei Raumtemperatur fixiert. Bei einer Färbung mit Phalloidin entfällt der erste Waschschrift mit PBS. Anschließend wurden die fixierten Zellen dreimal in PBS

gewaschen, in 0,5 % Triton-X 100 in PBS für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, um die Zellmembran zu permeabilisieren, und wiederum dreimal in PBS gewaschen.

Bei einer Färbung mit Antikörpern wurden die Zellen 1 h bei Raumtemperatur mit 10 % Serum (Ziegen-, Kaninchen- oder Hühnerserum) in PBS blockiert. Anschließend wurde der Primärantikörper (siehe 3.1.6.1) in 0,1 % Saponin und 10 % Serum (Ziegen-, Kaninchen- oder Hühnerserum) in PBS auf die Deckgläschen gegeben und bei 4 °C über Nacht inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Zellen mit PBS wurde der Sekundärantikörper (siehe 3.1.6.3) in 0,1 % Saponin und 10 % Serum (Ziegen-, Kaninchen- oder Hühnerserum) in PBS auf die Deckgläschen gegeben und 2 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Bei einer Färbung mit Phalloidin, wurden die Zellen für 20 min mit einer Phalloidinverdünnung in 1 % BSA in PBS (Phalloidin Texas Red, Invitrogen, Carlsbad, USA: 1:20; Phalloidin California Red, Biomol GmbH, Hamburg: 1:1000) inkubiert.

Nach Beendigung der letzten Färbung wurden die Zellen erneut dreimal mit PBS und anschließend kurz in H₂O (reinst) gewaschen, um Salzreste zu entfernen. Die Deckgläschen wurden mit „VECTASHIELD® Mounting Medium with DAPI“ (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA) auf einem Objektträger eingedeckelt, so dass sich die Zellen zwischen Deckgläschen und Objektträger befanden. Um ein Austrocknen zu verhindern, wurden die Ränder mit Nagellack versiegelt. Die Deckgläschen wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop (DMR, Leica, Wetzlar, Objektiv 100×, numerische Apertur: 1,35) analysiert.

3.2.5 Statistische Auswertung

Die arithmetischen Mittel wurden nach folgender Formel errechnet und die Standardabweichungen nach folgender Formel geschätzt:

Arithmetisches Mittel (\bar{x}):

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n}$$

Standardabweichung (SD):

$$SD = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

Dabei ist n der Stichprobenumfang, also die Anzahl an Werten und x_i die Merkmalsausprägung im i -ten Element. Die Berechnung der statistischen Signifikanz p erfolgte mittels ungepaartem t -Test. Dies wurde online über <http://graphpad.com/quickcalcs/ttest1/> durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Einfluss von DYRK-Familienmitgliedern auf GLI-Transkriptionsfaktoren

Der Einfluss der verschiedenen DYRK-Familienmitglieder auf GLI1 und GLI2, die Transkriptionsfaktoren des HH-Signalwegs, die hauptsächlich für dessen Aktivierung verantwortlich sind, wurde mittels eines Luziferaseexperiments in NIH3T3 getestet. Dazu wurden in NIH3T3-Zellen V5-getaggte DYRKs mit EGFP-getagkten GLI-Konstrukten (GLI1, GLI1ΔN und GLI2) kotransfiziert. Zusätzlich wurde ein Reportergenplasmid für HH-Aktivität (12xGliLuc) und ein Plasmid mit konstitutiv exprimierter βGalaktosidase (pSV-βGal) für die Normalisierung kotransfiziert. Wie Abbildung 4.1A zeigt, führten DYRK1A, DYRK2, DYRK3 und DYRK4 ohne kotransfiziertes GLI zu einer erhöhten Aktivität der Luziferase, die für alle Kinasen etwa gleiche Dimensionen aufweist. Lediglich DYRK1B hat keinen Einfluss auf die Aktivität des Reportergens. Um diesen Effekt auf den endogenen HH-Signalweg zu vernachlässigen, wurden die jeweiligen Aktivitäten mit kotransfiziertem GLI auf die jeweilige Aktivität ohne GLI normalisiert (siehe Abbildung 4.1C).

DYRK1A-V5 führt zusammen mit GLI1-EGFP zu einer verstärkten Aktivität des HH-Reporters im Vergleich zu dem Leervektor mit GLI1-EGFP. Die Kinase DYRK1B-V5 zeigt einen signifikanten, aber vernachlässigbaren Anstieg der Luziferaseaktivität im Vergleich zum Leervektor mit GLI1-EGFP. DYRK2-V5 und DYRK3-V5 zeigen keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zum Leervektor mit GLI1-EGFP. DYRK4-V5 führt zu einer schwachen Reduktion der Luziferaseaktivität. Die N-terminal trunkierte Variante von GLI1-EGFP (GLI1ΔN-EGFP) zeigt mit keiner der Kinasen eine stärkere Stimulation als mit dem Leervektor. DYRK3-V5 und DYRK4-V5 zeigen eine leicht schwächere Zunahme der Aktivität durch GLI1ΔN-EGFP im Vergleich zum Leervektor. GLI2-EGFP führt generell zu einer schwächeren Aktivierung des HH-Reporters als GLI1-EGFP und GLI1ΔN-EGFP. DYRK1A-V5 zeigt auch hier die stärkste Erhöhung der Aktivität im Vergleich zum Leervektor. Auch DYRK2-V5 und DYRK3-V5 zeigen eine deutliche Steigerung der HH-Reporteraktivität. DYRK1B-V5 führt zu keiner weiteren Erhöhung und DYRK4-V5 führt zu einer leichten Verminderung des Signals. Die Expressionslevel der DYRKs (siehe Abbildung 4.1B) sind trotz des gleichen Vektor-„Backbones“ und gleicher eingesetzter Plasmidmengen (in µg) stark unterschiedlich. DYRK1A wird am stärksten exprimiert. Die Expression von DYRK1B ist schwächer, aber dennoch stark. DYRK2, DYRK3 und DYRK4 weisen ähnliche Expressionslevel auf, die aber wesentlich schwächer sind als die von DYRK1B und vor allem DYRK1A.

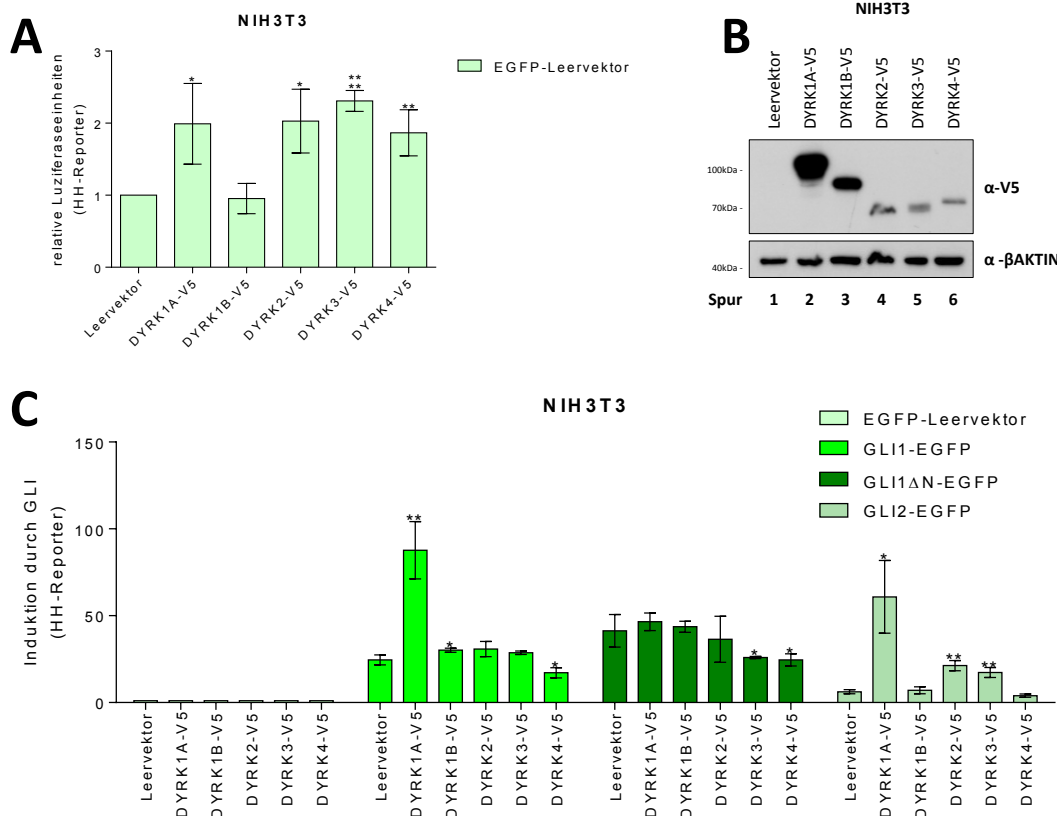


Abbildung 4.1: Einfluss von DYRK-Familienmitgliedern auf GLI1 und GLI2. (A) Einfluss der verschiedenen DYRK-Familienmitglieder im Luciferaseexperiment auf den 12xGliLuc-Reporter für HH-Aktivität. DYRK1A-V5, DYRK2-V5, DYRK3-V5 und DYRK4-V5 beeinflussen den Reporter positiv. (B) Expressionsanalyse der verwendeten DYRK-V5-Konstrukte mittels Westernblot. (C) Einfluss der verschiedenen DYRK-Familienmitglieder im Luciferaseexperiment auf den 12xGliLuc-Reporter zusammen mit GLI1-EGFP, GLI1ΔN-EGFP und GLI2-EGFP. ****: $p < 0,0001$; ***: $p < 0,001$; **: $p < 0,01$; *: $p < 0,05$; signifikanter Unterschied zur Kontrollprobe ((A) Leervektor; (B) Leervektor mit jeweiligem GLI-EGFP-Konstrukt); t-Test; $n = 3$.

Der Effekt der Kinasen auf den Reporter ohne die zusätzliche Kotransfektion von GLI-Transkriptionsfaktoren lässt sich durch mögliche Einflüsse auf endogenes GLI zurückführen, vor allem GLI2 und GLI3 liegen im endogenen Zustand in ausreichenden Mengen vor (Daten nicht gezeigt). Aber auch die Aktivierung oder Deaktivierung anderer Effektoren, die den HH-Signalweg beeinflussen, lässt sich nicht ausschließen. Möglicherweise beeinflussen die Kinasen durch ihre Überexpression auch den Reporter direkt. Dieser Effekt lässt sich herausrechnen, um ausschließlich den Effekt der Kinasen auf die Transkriptionsfaktoren GLI1, GLI1ΔN und GLI2 zu isolieren. Hier zeigt sich, dass die Kinase DYRK1A, die auch am stärksten von den Zellen exprimiert wird, den stärksten Effekt auf beide Proteine hat. Der stimulierende Effekt für GLI1 benötigt den N-Terminus des Proteins, da die trunkierte Variante keinerlei Stimulation mehr zeigt. Der N-Terminus muss also für die Aktivierung durch DYRK1A kritische Elemente enthalten. Dies könnten entweder die Phosphorylierungsstelle(n) direkt sein oder eine Bindestelle für DYRK1A. Keine der anderen Kinasen zeigt einen stimulatorischen Effekt auf GLI1 oder ihre Variante. DYRK4 zeigt eine Inhibition von GLI1, die unabhängig vom Vorhandensein des N-Terminus von GLI1 ist. Auch DYRK3 zeigt eine leichte Inhibition. Diese scheint nur dann

ausgeprägt zu sein, wenn der N-Terminus fehlt, was möglicherweise durch eine veränderte Tertiärstruktur in dieser GLI1-Variante erklärt werden kann. DYRK1A zeigt auch für GLI2 die deutlichste Stimulation. Aber auch DYRK2 und DYRK3 zeigen eine deutliche Stimulation, was zumindest für DYRK2 der Literatur widerspricht (Katoh und Katoh, 2008; Varjosalo et al., 2008). DYRK4 zeigt auch hier eine leichte Inhibition von GLI2. Da DYRK1A den stärksten und zuverlässigsten Effekt und die beste Expression zeigte, wurde im Folgenden der Mechanismus dieser Stimulation genauer untersucht.

4.2 DYRK1A aktiviert GLI1 durch Phosphorylierung und führt zu einer Translokation in den Kern

In der Literatur ist bereits beschrieben, dass DYRK1A GLI1 phosphoryliert und zu einer Translokation in den Kern führt (Mao et al., 2002). Die Konsensussequenz für eine Phosphorylierung durch DYRK1A (RPX(S/T)P) (Himpel et al., 2000) hat sehr starke Ähnlichkeit zu einem publizierten allgemeinen Kerntranslokationssignal (SPS) (Chuderland et al., 2008). Da die Aktivierung von GLI1 durch DYRK1A den N-Terminus des Transkriptionsfaktors benötigt (Shimokawa et al., 2008), wurde dieser nach möglichen Phosphorylierungsstellen untersucht, die gleichzeitig als Kerntranslokationssignal dienen könnten (siehe Abbildung 4.2A). In Vorarbeiten der Gruppe wurden verschiedene Mutanten von Flag-getaggtm GLI1 kloniert, die anstatt eines Serins an der entsprechenden Stelle ein nicht mehr phosphorylierbares Alanin enthalten (GLI1(102/104A), GLI1(116A), GLI1(130/132A), GLI1(146/148A), GLI1(102/104/116A) und GLI1(102/104/130/132A)). Die Mutanten wurden ebenfalls in Vorarbeiten in einem Luziferaseexperiment getestet. Dazu wurde jeweils eine GLI1-Variante mit DYRK1A oder einem Leervektor kotransfiziert und die relative Induktion durch DYRK1A verglichen (siehe Abbildung 4.2B). Lediglich die GLI1(102/104/130/132A)-Mutante zeigte ebenso wie die N-terminal trunkierte Variante keine Induzierbarkeit durch DYRK1A mehr. Um dieses Ergebnis zu bestätigen und für spätere fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen wurden die Mutationen S102/104/130/132A in das in Abbildung 4.1 verwendete GLI1-EGFP eingefügt. Zusätzlich wurde eine S102/104/130/132D-Mutante kreiert. Die Mutation von Serin zu Aspartat ahmt ein phosphoryliertes Serin nach, wie die folgenden Experimente bestätigen (siehe Abbildung 4.2D, E). Diese neuen Mutanten wurden erneut in einem Luziferaseexperiment in NIH3T3 getestet. Dazu wurde entweder HA-getaggtm DYRK1A oder ein Leervektor mit einer GLI1-EGFP-Variante (GLI1, GLI1ΔN, GLI1-S102/104/130/132A, GLI1-S102/104/130/132D) oder dem entsprechenden Leervektor kotransfiziert. Zusätzlich wurde wie in 4.1 ein Reportergenplasmid für HH-Aktivität (8xGliLuc) und ein Plasmid mit konstitutiv exprimierter βGalaktosidase (pSV-βGal) für die Normalisierung kotransfiziert. Zusätzlich wurde das ganze Experiment mit einem Reportergenplasmid mit mutierten GLI-Bindestellen (8xmut.Gli) durchgeführt. Die Aktivitäten

mit 8xGliLuc wurden auf die mit 8xmut.Gli normalisiert. Wie Abbildung 4.2C zeigt, führt auch hier DYRK1A zu einer erhöhten Luziferaseaktivität ohne GLI1. Um den Effekt von DYRK1A auf die GLI1-Variante besser sehen zu können, wurde diese Stimulation wie unter 4.1 beschrieben herausgerechnet (siehe Abbildung 4.2D). GLI1-EGFP zusammen mit dem Leervektor führt zu einer stärkeren Aktivität der Luziferase, als die Kombination der beiden Leervektoren. Die Erhöhung der Aktivität durch GLI1-EGFP zusammen mit DYRK1A ist dabei noch einmal stärker. Die N-terminal trunkierte Variante führt in Kombination mit dem Leervektor zu einer vergleichbaren Steigerung der Luziferaseaktivität wie GLI1 mit voller Länge (im Weiteren als GLI1^{fl} bezeichnet). Die Kombination mit DYRK1A führte für diese Variante zu keiner weiteren Erhöhung. Die nicht-phosphorylierbare Serin-zu-Alanin Mutante führte alleine ebenfalls zu einer vergleichbaren Luziferaseaktivität wie GLI1^{fl} und die Δ N-Variante. Die Kombination mit DYRK1A hat eine fast identische Steigerung der Aktivität zur Folge. Am stärksten von allen GLI1-Varianten erhöht die Serin-zu-Aspartat-Mutante die Luziferaseaktivität und auch in Kombination mit DYRK1A zeigt sich eine ähnlich hohe Steigerung der Aktivität, allerdings führt DYRK1A auch hier zu keiner zusätzlichen Erhöhung der Aktivität. Ein ähnliches Bild zeigt sich bei der Verwendung des 12xGliLuc-Reporters (siehe Abbildung 6.1). Die verwendeten GLI1-Varianten wurden für fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen transient in embryonale Mausfibroblasten (MEF) transfiziert (siehe Abbildung 4.2E). GLI1-EGFP zeigte dabei zunächst eine cytoplasmatische Verteilung. Durch die Kotransfektion von DYRK1A-HA änderte sich die Lokalisierung von GLI1-EGFP in den Zellkern. GLI1 Δ N-EGFP zeigte ebenfalls ein dominantes Signal im Cytoplasma und auch bei einer Kotransfektion mit DYRK1A-HA bleibt das Signal hauptsächlich cytoplasmatisch. Das gleiche Bild zeigte sich für GLI1-S102/104/130/1032A-EGFP. Sowohl mit als auch ohne DYRK1A-HA war das Signal des EGFP im Cytoplasma deutlich überrepräsentiert. GLI1-S102/104/130/1032D-EGFP zeigte ebenfalls eine von DYRK1A-HA unabhängige Verteilung. Allerdings eine andere als GLI1 Δ N-EGFP und GLI1-S102/104/130/1032A-EGFP. Das Signal des EGFPs ist hier annähernd gleich verteilt mit einer leichten Dominanz im Zellkern.

Die Interaktion von SUFU mit GLI-Transkriptionsfaktoren ist bekannt dafür, dass sie zu einer Zurückhaltung von GLIs im Cytoplasma führt (Kogerman et al., 1999; Merchant et al., 2004; Murone et al., 2000). Die Bindestelle von SUFU in GLI1 (siehe Abbildung 4.2A, grün unterstrichen) liegt in der Nähe der DYRK1A-Phosphorylierungsstellen. Daher wurde im Folgenden die Bedeutung von SUFU für die Aktivierung von GLI1 durch DYRK1A untersucht.

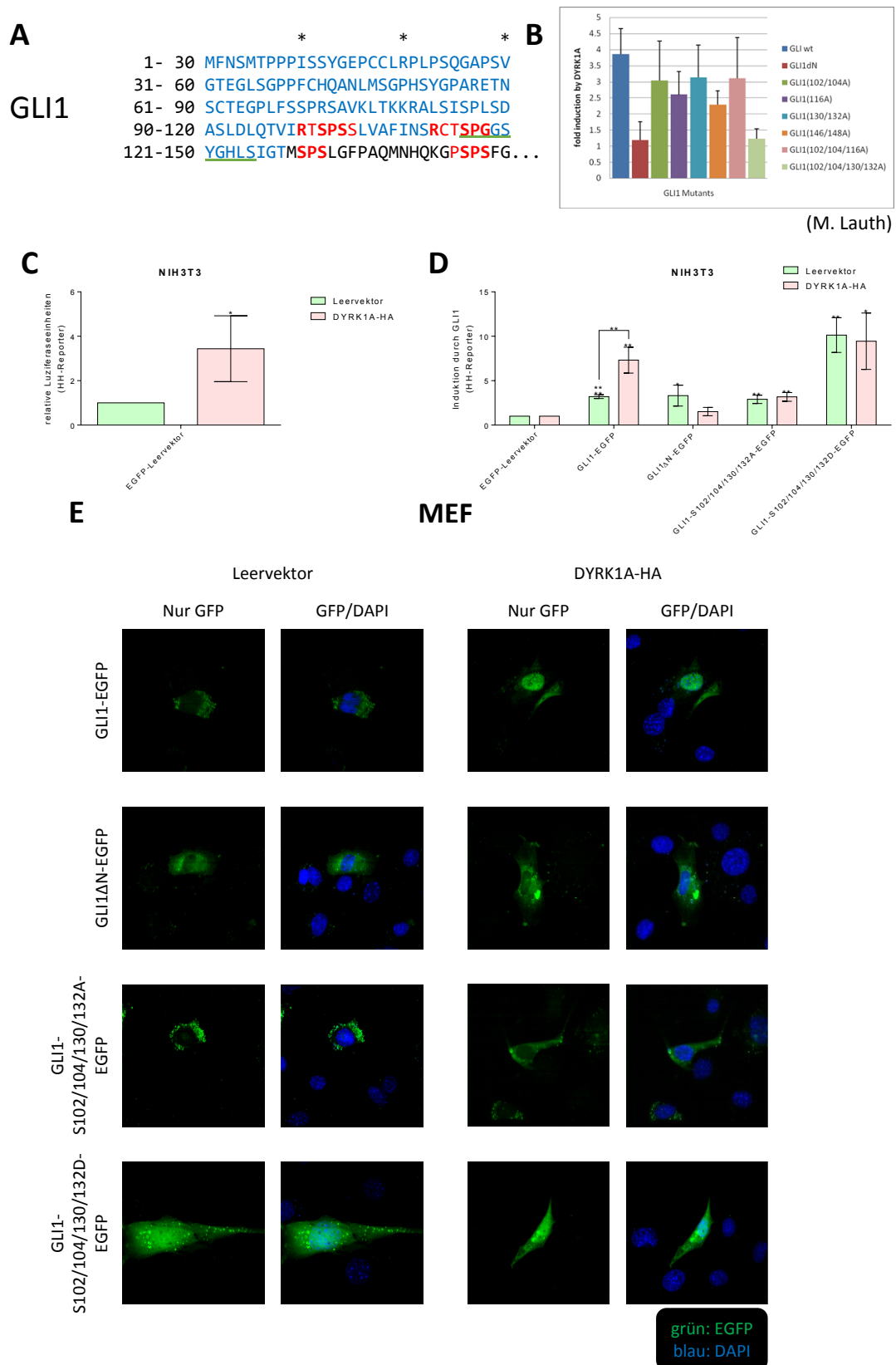


Abbildung 4.2: DYRK1A phosphoryliert GLI1. (A) Aminosäuresequenz der ersten 150 Aminosäuren des humanen GLI1-Proteins. Sterne markieren jede zehnte Aminosäure. In blau sind die ersten 128 Aminosäuren gezeigt, die in der Transkriptvariante „GLI1ΔN“ herausgespleißt werden. In rot sind die möglichen Phosphorylierungsstellen markiert, die sowohl der Konsensussequenz von DYRK1A (RPX(S/T)P) als auch dem allgemeinen Kerntranslokationssignal (SPS) ähneln. Grün unterstrichen ist der Aminosäurebereich, der die Interaktion mit SUFU vermittelt (Dunaeva, 2003 #352). (B) Luciferaseexperiment mit verschiedenen nicht-phosphorylierbaren Mutanten des humanen GLI1 in NIH3T3-Zellen (M. Lauth). (C) Effekt von DYRK1A-HA auf den 8xGliLuc-Reporter für HH-Aktivität im Luciferaseexperiment in NIH3T3-Zellen. (D) Effekt von DYRK1A-HA auf den 8xGliLuc-

und 8xmut.Gli-Reporter in Kombination mit GLI1-EGFP, GLI1ΔN-EGFP, der nicht-phosphorylierbaren Mutante GLI1-S102/104/130/132A-EGFP und der phosphomimetischen Mutante GLI1-S102/104/130/132D-EGFP in NIH3T3-Zellen. (E) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von MEF-Zellen mit den in (D) genannten GLI1-Varianten in Kombination mit oder ohne DYRK1A-HA. ****: $p < 0,0001$; ***: $p < 0,001$; **: $p < 0,01$; *: $p < 0,05$; signifikanter Unterschied zur Kontrollprobe ((A) EGFP-Leervektor mit Leervektor; (B) EGFP-Leervektor mit jeweiligem DYRK1A-Konstrukt); t-Test; $n = 3$.

4.3 Auswirkungen von DYRK1A auf die Interaktion von GLI1 mit SUFU

Dazu wurde zunächst erneut ein Luziferaseexperiment durchgeführt. In HEK293T-Zellen wurde GLI1 mit DYRK1A-HA oder einem Leervektor kotransfiziert und zusätzlich wurde eines von zwei shRNA-exprimierenden Plasmiden gegen humanes SUFU oder mit einer Kontroll-Sequenz kotransfiziert. Als Reportergenplasmid wurde 12xGliLuc und zum normalisieren pSV-βGal verwendet. Gezeigt ist jeweils der Unterschied mit und ohne DYRK1A (siehe Abbildung 4.3A). Bei der Kotransfektion von Kontroll-shRNA zeigt sich eine deutliche Stimulation bei der Kotransfektion von DYRK1A-HA im Vergleich zu dem Leervektor. Beide Ansätze mit einer Depletion von SUFU durch shRNA zeigen eine starke Erhöhung der Luziferaseaktivität mit der Kotransfektion von DYRK1A-HA im Vergleich zur Kontroll-shRNA. Abbildung 4.3B zeigt einen Vergleich der Expressionslevel von SUFU in HEK293T-Zellen nach Transfektion der Kontroll-shRNA beziehungsweise einem der beiden shhSUFU-Konstrukte. Die Transfektion mit shhSUFU#2 zeigt eine Reduktion des Proteinlevels und die Transfektion von shhSUFU#5 zeigt eine noch ausgeprägtere Depletion des Proteins.

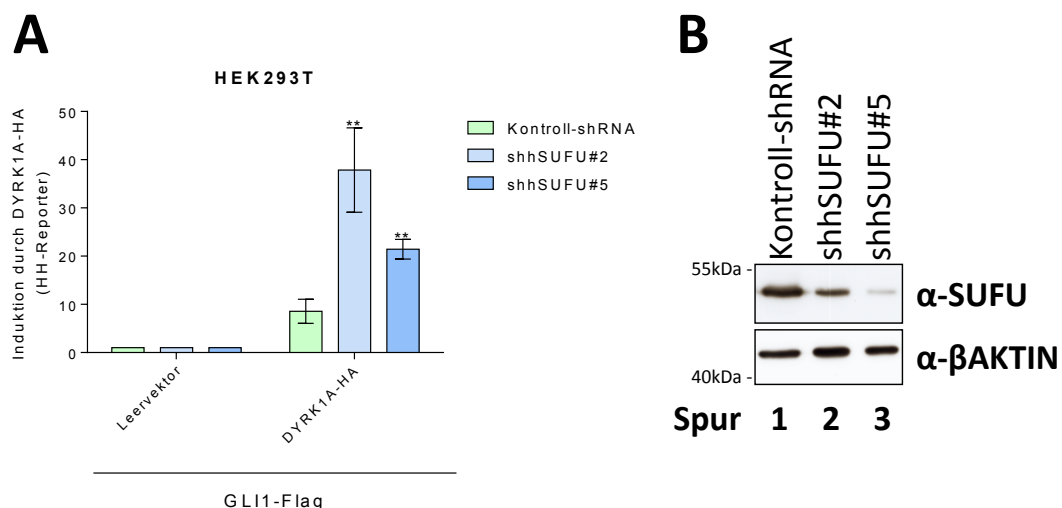


Abbildung 4.3: SUFU inhibiert die DYRK1A-vermittelte Aktivierung von GLI1. (A) Induktion von GLI1-Flag durch DYRK1A-HA im Luziferaseexperiment mit dem HH-Reporter 12xGliLuc in Abhängigkeit eines „Knockdowns“ von SUFU in HEK293T-Zellen. (B) Kontrolle der Effektivität der in (A) verwendeten shhSUFU-shRNAs in HEK293T-Zellen (M. Lauth). ****: $p < 0,0001$; ***: $p < 0,001$; **: $p < 0,01$; *: $p < 0,05$; signifikanter Unterschied zur Kontrollprobe (Kontroll-shRNA mit jeweiligem DYRK1A-Konstrukt); t-Test; $n = 3$.

Die Anwesenheit von SUFU in der Zelle hat einen klaren negativen Einfluss auf die Aktivierung von GLI1 über DYRK1A im Luziferaseexperiment. Eine mögliche Bindung von SUFU an DYRK1A und damit eine direkte Inhibition von DYRK1A über SUFU konnte allerdings nicht nachgewiesen

werden (Daten nicht gezeigt). Wie in Abbildung 4.2A gezeigt, liegt die SUFU Bindestelle in GLI1 in der Nähe der vier Phosphorylierungsstellen für DYRK1A. Möglicherweise konkurriert SUFU mit DYRK1A um GLI1. Um diese Hypothese zu testen, wurden Koimmunpräzipitationsexperimente durchgeführt. Die Interaktion von SUFU mit GLI1 wurde bereits mehrfach beschrieben (Kogerman et al., 1999; Pearse et al., 1999), sowie auch, dass die Interaktion mit SUFU zu einer Stabilisierung von GLI-Proteinen führt (Humke et al., 2010; Wang et al., 2010). Zunächst wurde in HEK293T-Zellen V5-getaggttes SUFU und Flag-getaggttes GLI1 transient kotransfiziert (siehe Abbildung 4.4A). Zusätzlich wurde DYRK1A-HA, kinaseinaktives DYRK1A-HA (DYRK1A-K188R-HA) oder ein Leervektor kotransfiziert. Über den V5-Tag wurde SUFU präzipitiert und GLI1 im Westernblot nachgewiesen. Zusätzlich wurde als Kontrolle jedes Protein für sich alleine transfiziert.

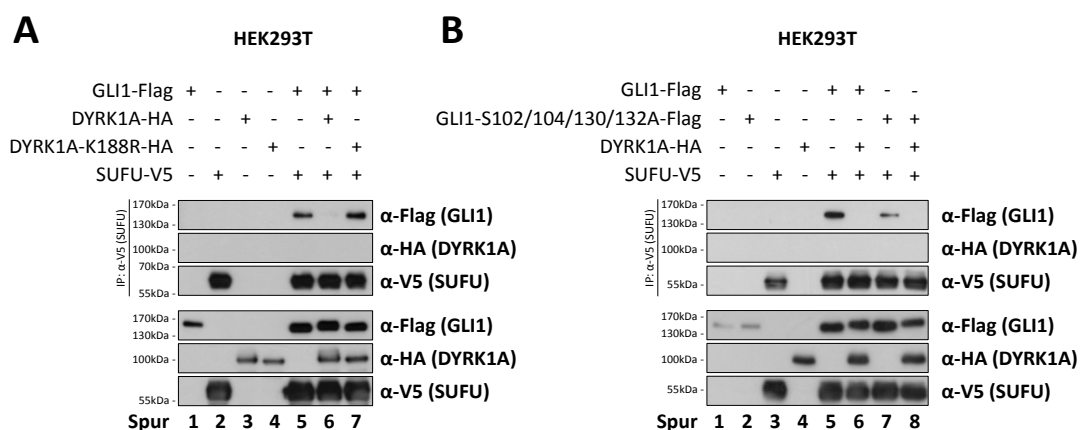


Abbildung 4.4: Modifikation der Interaktion von SUFU und GLI1 durch DYRK1A. (A) Koimmunpräzipitation von GLI1-Flag mit SUFU-V5 in An- oder Abwesenheit von DYRK1A-HA oder DYRK1A-K188R-HA in HEK293T-Zellen. (B) Koimmunpräzipitation von GLI1-Flag oder GLI1-S102/104/130/132A-Flag mit SUFU-V5 in An- oder Abwesenheit von DYRK1A-HA in HEK293T-Zellen.

Weder GLI1-Flag (Spur 1) noch DYRK1A-HA (Spur 3) oder DYRK1A-K188R-HA (Spur 4) konnten ohne das Vorhandensein von SUFU-V5 nach der Präzipitation im Westernblot nachgewiesen werden. Einzig SUFU-V5 ergab eine Bande im Westernblot (Spur 2). In der Kombination von von SUFU-V5 mit GLI1-Flag (Spur 5) ergab GLI1-Flag ein eindeutiges Signal nach der Präzipitation. Nach der Zugabe von DYRK1A-HA (Spur 6) verschwand dieses Signal vollständig. DYRK1A-HA selbst konnte nach der Präzipitation nicht nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu war DYRK1A-K188R-HA nicht in der Lage das Signal von GLI1-Flag nach der Präzipitation zu beeinflussen (Spur 7). Auch DYRK1A-K188R-HA konnte nicht im Präzipitat nachgewiesen werden. Die Gesamtzellextrakte vor der Präzipitation zeigen für GLI1-Flag eine deutliche Zunahme des Protein-Levels durch die Kotransfektion von SUFU (Spuren 5-6 im Vergleich zu Spur 1). Eine leichte Veränderung im Laufverhalten von GLI1-Flag durch die Kotransfektion von DYRK1A-HA (Spur 6), aber nicht durch DYRK1A-K188R-HA (Spur 7), nach oben war zu

beobachten. Die Expression von DYRK1A-HA, DYRK1A-K188R-HA und SUFU-V5 wurde in den jeweiligen Proben ebenfalls bestätigt.

Das veränderte Laufverhalten von GLI1-Flag durch DYRK1A-HA und nicht durch DYRK1A-K188R-HA ist ein weiterer Hinweis auf die bereits gezeigte Phosphorylierung von GLI1 durch DYRK1A. Die Interaktion von SUFU-V5 und GLI1-Flag konnte bestätigt werden. DYRK1A-HA kann diese Interaktion effektiv auflösen, benötigt dafür aber seine Kinaseaktivität. Möglicherweise phosphoryliert DYRK1A-HA GLI1-Flag, was zu einer veränderten Konformation von GLI1-Flag und einem Abfallen von SUFU-V5 von dem Transkriptionsfaktor führt.

In einem weiteren Experiment wurde untersucht, ob die nicht-phosphorylierbare Mutante von GLI1 (S102/104/130/132A) ebenfalls mit SUFU interagiert und welchen Einfluss DYRK1A auf diese Mutante hat. Dazu wurden erneut HEK293T-Zellen transient transfiziert. Diesmal mit Kombinationen aus GLI1-Flag, GLI1-S102/104/130/132A-Flag, DYRK1A-HA und SUFU-V5 transfiziert (siehe Abbildung 4.4B). Die einzelnen Proteine GLI1-Flag (Spur 1), GLI1-S102/104/130/132A-Flag (Spur 2) und DYRK1A-HA (Spur 4) konnten nicht im Präzipitat nachgewiesen werden. SUFU-V5 (Spuren 3, 5, 6, 7 und 8) konnte spezifisch präzipitiert werden. Erneut konnte GLI1-Flag durch SUFU-V5 präzipitiert werden (Spur 5) und durch Zugabe von DYRK1A-HA (Spur 6) ein „Shift“ im Laufverhalten im Gesamtzellextrakt und die Aufhebung der Interaktion mit SUFU-V5 gezeigt werden. Auch GLI1-S102/104/130/132A-Flag (Spur 7) konnte nach der Präzipitation von SUFU-V5 im Präzipitat nachgewiesen werden. DYRK1A-HA führte auch bei GLI1-S102/104/130/132A-Flag zu einem veränderten Laufverhalten (Spur 8). Ebenso war DYRK1A-HA in der Lage, das Signal von GLI1-S102/104/130/132A-Flag nach der Präzipitation verschwinden zu lassen.

DYRK1A-HA ist entgegen den Erwartungen in der Lage, die Interaktion von SUFU-V5 mit GLI1-S102/104/130/132A-Flag zu beeinflussen. Da Abbildung 4.4A zeigt, dass dafür die Kinaseaktivität vonnöten ist, und da in Abbildung 4.4B GLI1-S102/104/130/132A-Flag einen „Shift“ nach oben zeigt, gibt es für DYRK1A wohl noch weitere Phosphorylierungsstellen in GLI1, die die Interaktion des Proteins mit SUFU modellieren, aber nicht für dessen Aktivierung und Translokation in den Kern verantwortlich sind.

4.4 Endogenes DYRK1A hat keinen Einfluss auf die Empfänglichkeit des HH-Signalwegs für SAG in NIH3T3-Zellen

Um ein Werkzeug zu erhalten, mit dem DYRK1A in Zellen effektiv inhibiert werden kann, wurde der DYRK1A-Inhibitor Harmin getestet (Bain et al., 2007). Zur Bestimmung der Wirksamkeit von Harmin wurde ein Luziferaseexperiment durchgeführt. Dazu wurden NIH3T3-Zellen mit HA-GLI1

und DYRK1A-HA beziehungsweise DYRK1A-K188R-HA kotransfiziert. Als Reportergenplasmid wurde 12xGliLuc und zum Normalisieren pSV-βGal verwendet. Diese Zellen wurden für 24 h mit unterschiedlichen Konzentrationen Harmin (0 μM, 0,5 μM, 1 μM, 5 μM, 10 μM) behandelt und anschließend die Luziferaseaktivität gemessen (siehe Abbildung 4.5A). Die Luziferaseaktivität aller Zellen mit HA-GLI1 und kinaseinaktivem DYRK1A-K188R-HA ist auf einem vergleichbaren Niveau. Die Zellen mit HA-GLI1 und DYRK1A-HA zeigen generell eine deutliche Erhöhung der Luziferaseaktivität. Bei allen mit Harmin behandelten Zellen zeigte sich eine niedrigere Aktivität des Reportergens im Vergleich zu den Kontrollzellen. Mit steigenden Konzentrationen verstärkte sich dieser Effekt, so dass bei 1 μM Harmin bereits eine 2,8-fache Reduktion zu sehen war. 5 μM Harmin führte zu einer 6,5-fachen Reduktion, die sich durch eine erneute Erhöhung der Harminkonzentration auf 10 μM nicht weiter steigern ließ. Allerdings lag die Aktivität immer noch deutlich über der von Zellen mit kotransfiziertem HA-GLI1 und DYRK1A-K188R-HA.

Die durch die Kinasefunktion von DYRK1A induzierte Aktivierung von GLI1 ließ sich mittels des DYRK1A-Inhibitors Harmin effektiv inhibieren. Eine komplette Blockade der Kinase konnte allerdings nicht erreicht werden.

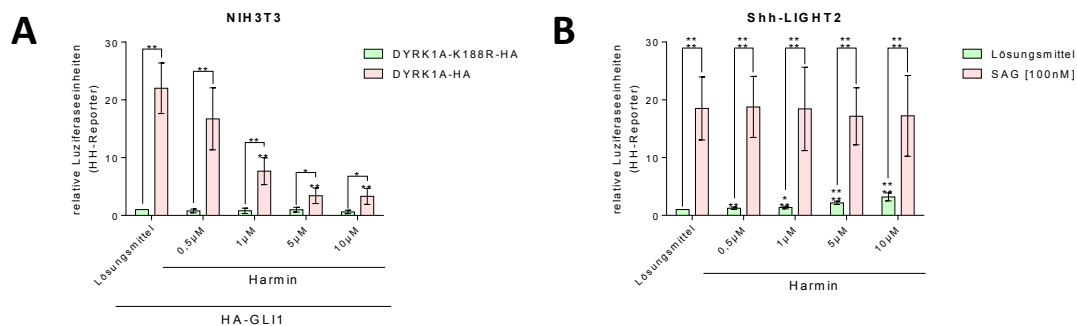


Abbildung 4.5: Einfluss des DYRK1A-Inhibitors Harmin auf den HH-Signalweg. (A) Einfluss von Harmin auf die Stimulation von HA-GLI1 durch DYRK1A-HA und DYRK1A-K188R-HA im Luziferaseexperiment mit dem HH-Reporter 12xGliLuc in NIH3T3-Zellen. (B) Einfluss einer Inhibition des endogenen DYRK1A durch Harmin auf die Stimulation des HH-Signalwegs mittels SAG in Shh-LIGHT2-Zellen in Vollmedium. ****: $p < 0,0001$; ***: $p < 0,001$; **: $p < 0,01$; *: $p < 0,05$; signifikanter Unterschied zur Kontrollprobe ((A) Lösungsmittel mit jeweiligem DYRK1A-Konstrukt; (B) Lösungsmittel für Harmin jeweils mit oder ohne SAG-Behandlung); t-Test; (A) $n = 3$; (B) $n = 9$.

Bisher zeigten alle Experimente nur den Effekt von exogenem DYRK1A auf den HH-Signalweg beziehungsweise auf GLI1. Mittels des getesteten Inhibitors Harmin sollte nun endogenes DYRK1A auf seine Funktion im HH-Signalweg hin untersucht werden. Dazu wurden Shh-LIGHT2-Zellen verwendet (Taipale et al., 2000). Diese Zellen besitzen ein stabil ins Genom integriertes Luziferasereporter, das dem 8xGliLuc-Reporter entspricht. Auch ein Konstrukt, das für eine konstitutive Expression von Luziferase aus *Renilla reniformis* zur Normalisierung sorgt, ist stabil integriert. Diese Zellen wurden im konfluenten Zustand auf Vollmedium (siehe Abbildung 4.5B) beziehungsweise mit 1 % FBS (siehe Abbildung 6.2) für 24 h mit 100 nM SAG oder dem Lösungsmittel stimuliert, um den HH-Signalweg zu aktivieren (siehe 3.2.1.5). Zusätzlich wurden

zur gleichen Zeit verschiedene Konzentrationen Harmin ins Medium gegeben. Die Luziferaseaktivität ohne die Zugabe von SAG (grüne Balken) zeigt einen geringen stetigen Anstieg der bereits bei 0,5 μM Harmin statistisch signifikant, aber mit 1,2-fach sehr gering ist. Durch die Zugabe von Harmin bei 5 μM Harmin ist die Luziferaseaktivität 2,2-fach höher als ohne Harmin und bei 10 μM Harmin zeigt sich ein 3,2-facher Anstieg der Luziferaseaktivität. Durch die Zugabe von SAG steigt die Luziferaseaktivität ohne Harmin auf das 19-fache an. Die Luziferaseaktivität der Proben mit verschiedenen Konzentrationen an Harmin zeigt keinen statistisch signifikanten Unterschied zu der Probe ohne Harmin.

Der Anstieg der Luziferase- und damit der HH-Aktivität im basalen Zustand ohne Stimulation durch SAG deutet eine inhibierende Wirkung von DYRK1A auf den HH-Signalweg an. Dies steht im Widerspruch zu den bisher erlangten Ergebnissen. In den bisherigen Experimenten wurde der HH-Signalweg allerdings durch die Überexpression von GLI1 (oder GLI2) aktiviert. Möglicherweise besitzt DYRK1A je nach Status des HH-Signalwegs unterschiedliche Aufgaben. In Zellen, die mit SAG stimuliert wurden zeigt sich keinerlei Auswirkung von DYRK1A auf den HH-Signalweg. Möglicherweise kommt die stimulierende Wirkung von DYRK1A auf den HH-Signalweg nur bei dessen Überexpression zustande. Die Überexpression von DYRK1A findet sich im lebenden Organismus beispielsweise bei Patienten mit Trisomie 21. Harmin inhibiert nicht nur DYRK1A, sondern auch DYRK1B, allerdings um den Faktor 5 schwächer. Auch die Inhibition von DYRK2 und DYRK3 durch Harmin darf bei der Interpretation dieser Ergebnisse nicht außer Acht gelassen werden, auch wenn die Inhibition dieser beiden DYRK-Familienmitglieder um den Faktor 50 schwächer ist als bei DYRK1A (Bain et al., 2007; Gockler et al., 2009).

4.5 Eine Depletion von DYRK1A hat nur in Zellen neuronalen Ursprungs Auswirkungen

Um die Bedeutung von endogenem DYRK1A weiter zu untersuchen, wurden mehrere Zelllinien mit siRNA transfiziert, die zu einer spezifischen Depletion von *DYRK1A* führt. Zunächst wurde die Auswirkung eines solchen „Silencing“ in den humanen HEK293T-Zellen getestet. Weiterhin wurde die ebenfalls humane Krebszelllinie SU.86.86 verwendet. Die Effektivität des „Knockdowns“ wurde sowohl mittels quantitativer RT-PCR auf Transkriptebeine, sowie mittels Westernblot auf Proteinebene überprüft. Weiterhin wurden Auswirkungen auf das Hauptzielgen *GLI1* auf Transkript- und Proteinebene untersucht. In HEK293T-Zellen (siehe Abbildung 4.6A) zeigt sihDYRK1A#1 keinen signifikanten Unterschied zur Kontroll-siRNA#1. sihDYRK1A#2 führt zu einer signifikanten, jedoch schwachen, Reduktion auf 0,87. Die *DYRK1A*-Transkriptmengen sind bei beiden Kontrollen auf einem vergleichbaren Niveau. Mit einer Reduktion auf 0,25 (sihDYRK1A#1) und 0,32 (sihDYRK1A#2) zeigt sich eine deutliche Depletion

durch beide siRNAs. Der „Knockdown“ von *DYRK1A* zeigt sich auch auf Proteinebene (siehe Abbildung 4.6C). In SU.86.86 zeigt sich ein ähnliches Bild (siehe Abbildung 4.6B). Die *GLI1*-Level nach „Knockdown“ zeigen keinen signifikanten Unterschied zu Kontroll-siRNA#1. Auch hier zeigt sich eine signifikante Depletion von *DYRK1A* auf 0,094 (sihDYRK1A#1) und 0,19 (sihDYRK1A#2) im Vergleich zur Kontroll-siRNA#1. Die Effektivität des Knockdowns konnte ebenfalls auf Proteinebene bestätigt werden (siehe Abbildung 4.6D).

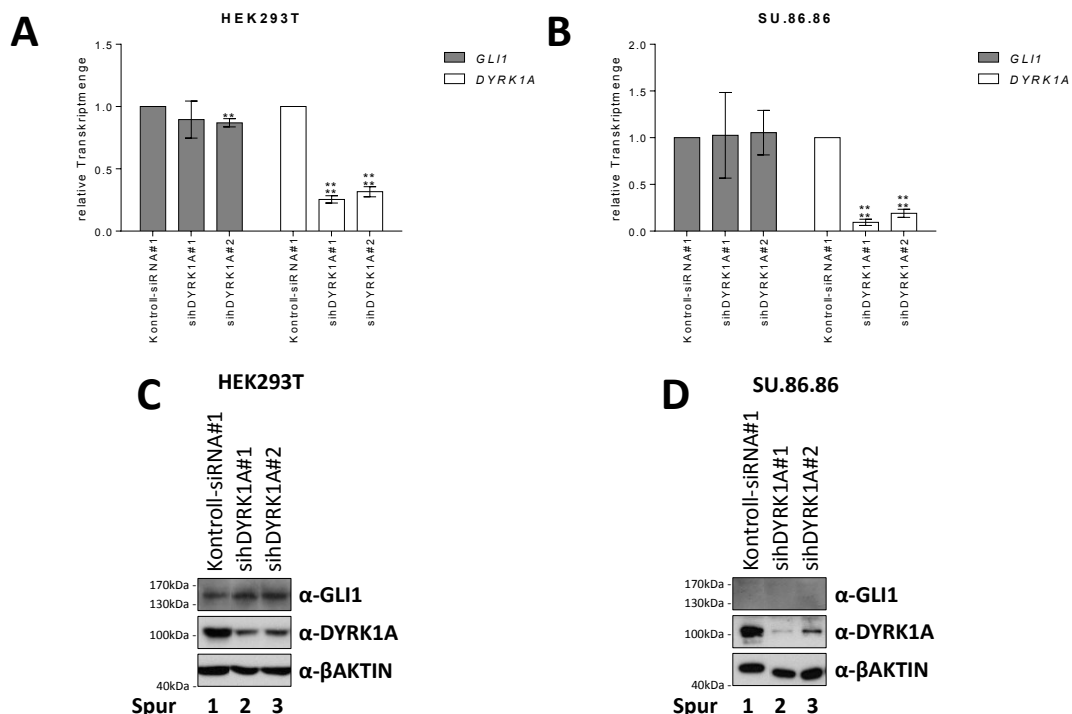


Abbildung 4.6: Depletion von *DYRK1A* zeigt keinen Effekt auf die HH-Aktivität in den humanen Zelllinien HEK293T und SU.86.86. (A) Messung der Transkriptlevel von *GLI1* und *DYRK1A* nach *DYRK1A*-„Knockdown“ in HEK293T-Zellen. (B) Messung der Transkriptlevel von *GLI1* und *DYRK1A* nach *DYRK1A*-„Knockdown“ in SU.86.86-Zellen. (C) Westernblot für *GLI1*, *DYRK1A* und β AKTIN nach *DYRK1A*-„Knockdown“ in HEK293T-Zellen. (D) Westernblot für *GLI1*, *DYRK1A* und β AKTIN nach *DYRK1A*-„Knockdown“ in SU.86.86-Zellen. ****: $p < 0,0001$; ***: $p < 0,001$; **: $p < 0,01$; *: $p < 0,05$; signifikanter Unterschied zur Kontrollprobe (Kontroll-siRNA#1); t-Test; $n = 3$.

Als weitere Testzelllinien wurden zwei Zelllinien embryonaler Mausfibroblasten (MEF) mit einen „Knockout“ in einem negativen Regulator des HH-Signalwegs verwendet. Das Fehlen von *SUFU* oder *PTCH1* in diesen Zellen führt zu einer konstitutiven Aktivierung des Signalwegs (Goodrich et al., 1997; Svard et al., 2006; Taipale et al., 2000). *Sufu*^{-/-}-Zellen zeigen für beide Kontroll siRNAs und beide siRNA gegen murines *Dyrk1a* keinen signifikanten Unterschied (siehe Abbildung 4.7A). *Ptch1* zeigt ebenfalls für Kontroll-siRNA#2 und simDyrk1a#2 keinen signifikanten Unterschied zu Kontroll-siRNA#1. simDyrk1a#4 zeigt zwar eine signifikante Depletion zu Kontroll-siRNA#1, aber nicht zu Kontroll-siRNA#2. *Dyrk1a* wird durch die siRNAs signifikant auf 0,27 (simDyrk1a#2) und 0,093 (simDyrk1a#4) im Vergleich zu Kontroll-siRNA#1 reduziert. Kontroll-siRNA#2 zeigt keinen signifikanten Unterschied zu Kontroll-siRNA#1. Auch im Westernblot (siehe Abbildung 4.7C) zeigt sich eine deutliche Verminderung von *DYRK1A* auf Proteinebene für beide siRNAs im

Vergleich zur Kontrolle. Die *GLI1*-Level zeigen ein ähnliches Niveau. In *Ptch1*^{-/-}-Zellen zeigt das *Gli1*-Transkriptlevel für Kontroll-siRNA#2 einen signifikanten Anstieg auf 1,4. *simDyrk1a#2* und *simDyrk1a#4* zeigen weder zu Kontroll-siRNA#1 noch zu Kontroll-siRNA#2 einen signifikanten Unterschied (siehe Abbildung 4.7B). Da die Zellen einen „Knockout“ im *Ptch1*-Gen besitzen, konnte dieses Zielgen nicht gemessen werden. *Dyrk1a* wurde durch die beiden spezifischen siRNAs auf 0,49 (*simDyrk1a#2*) und 0,14 (*simDyrk1a#4*) im Vergleich zu Kontroll-siRNA#1 reduziert. Im Westernblot zeigt sich ebenfalls eine deutliche Reduktion von DYRK1A durch die beiden *simDyrk1a*-siRNAs (siehe Abbildung 4.7D). *GLI1* ist in allen drei Proben auf einem ähnlichen Niveau.

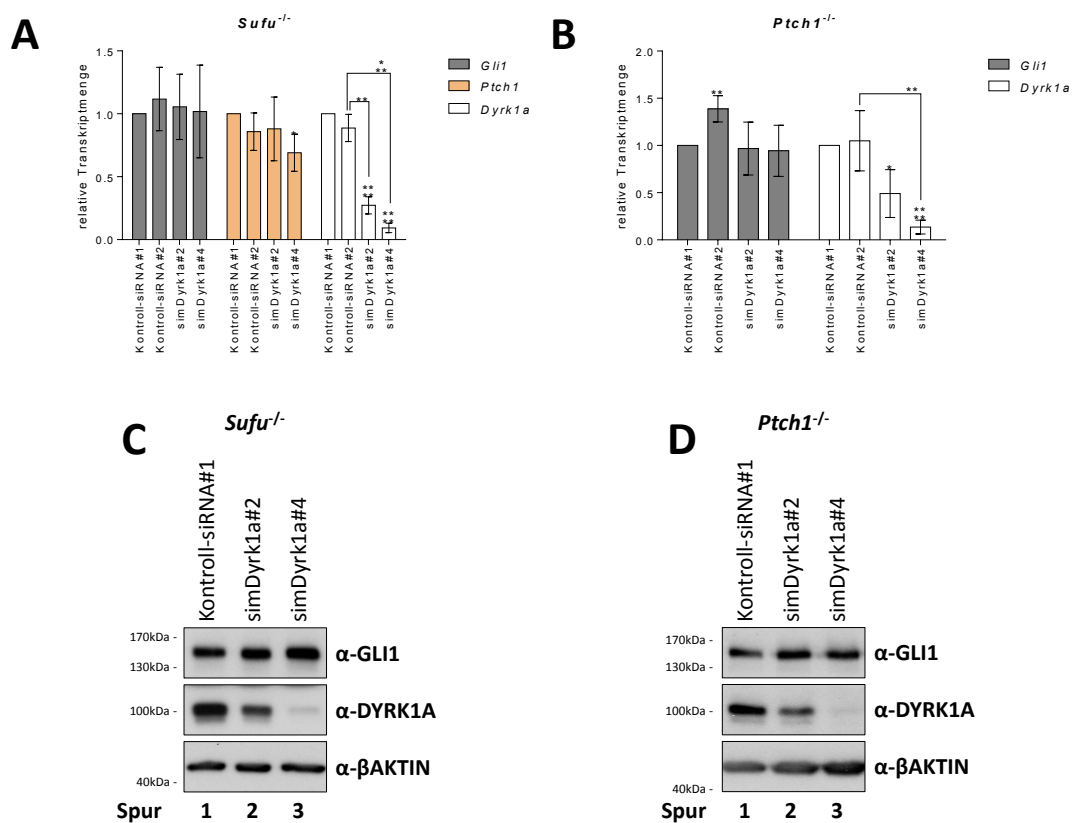


Abbildung 4.7: Depletion von DYRK1A zeigt keinen Effekt auf die HH-Aktivität in MEF-Zellen mit aktivem HH-Signalweg. (A) Messung der Transkriptlevel von *Gli1*, *Ptch1* und *Dyrk1a* nach *Dyrk1a*-„Knockdown“ in *Sufu*^{-/-}-Zellen. (B) Messung der Transkriptlevel von *Gli1* und *Dyrk1a* nach *Dyrk1a*-„Knockdown“ in *Ptch1*^{-/-}-Zellen. (C) Westernblot für *GLI1*, *DYRK1A* und β AKTIN nach *DYRK1A*-„Knockdown“ in *Sufu*^{-/-}-Zellen. (D) Westernblot für *GLI1*, *DYRK1A* und β AKTIN nach *DYRK1A*-„Knockdown“ in *Ptch1*^{-/-}-Zellen. ****, $p < 0,0001$; ***, $p < 0,001$; **, $p < 0,01$; *, $p < 0,05$; signifikanter Unterschied zur Kontrollprobe (Kontroll-siRNA#1); t-Test; $n = 3$.

Für keine der hier verwendeten Zelllinien lässt sich ein eindeutiger Effekt eines „Knockdowns“ von *DYRK1A* nachweisen. Weder die epithelialen Zelllinien SU.86.86 und HEK293T – mit Ausnahme der schwachen und wohl vernachlässigbaren Reduktion von *GLI1* durch *sihDYRK1A#2* – noch die Fibroblasten mit aktivem HH-Signalweg zeigen eine Veränderung des *GLI1*-Level nach einer Depletion von *DYRK1A*. Die Kinase scheint in diesen Zelllinien keine Bedeutung für den HH-Signalweg zu haben.

Da DYRK1A vor allem in neuronalen Prozessen eine Rolle spielt und bei Überexpression im Falle der Trisomie 21 zu Symptomen des Down-Syndroms beiträgt (Hammerle et al., 2003b; Park et al., 2009), wurden die humanen Krebszelllinien T98G und DAOY ebenfalls untersucht. T98G sind fibroblastenartige Glioblastomzellen und DAOY Medulloblastomzellen. In DAOY-Zellen lässt sich außerdem der HH-Signalweg über SAG aktivieren. *DYRK1A* lässt sich in T98G effektiv über siRNA herunterregulieren (siehe Abbildung 4.8A). Die Transkriptlevel von *DYRK1A* liegen bei 0,22 (sihDYRK1A#1) und 0,33 (sihDYRK1A#2). Im Gegensatz zu den vorherigen Zelllinien zeigt auch *GLI1* eine deutliche Depletion nach *DYRK1A*-„Knockdown“. Die Transkriptlevel liegen für sihDYRK1A#1 bei 0,58 und für sihDYRK1A#2 bei 0,56. Auch *PTCH1* wird herunterreguliert auf 0,79 für sihDYRK1A#1 und 0,54 für sihDYRK1A#2. DAOY-Zellen (siehe Abbildung 4.8B) zeigen ebenfalls eine effektive Depletion der *DYRK1A*-Transkriptes auf 0,20 (sihDYRK1A#1) und 0,30 (sihDYRK1A#2). Die Behandlung der Zellen mit SAG hatte keinen Einfluss auf die Menge an *DYRK1A*-mRNA. *GLI1* wurde in den mit Kontroll-siRNA#1 transfizierten Zellen von 1,0 auf 1,9 angehoben. sihDYRK1A#1 führte ohne SAG zu einer Depletion auf 0,41 mit SAG wurde das Transkriptlevel auf 4,2 angehoben, was einer 10-fachen Induktion entspricht. Ohne SAG hatte sihDYRK1A#2 keinen Einfluss auf das *GLI1*-Level (0,92). Nach Stimulation mit SAG wurde es auf 4,1 angehoben, was einer 4,5-fachen Induktion entspricht. *PTCH1* zeigt in der Kontrolle eine geringe Stimulation mit SAG auf 1,3. sihDYRK1A#1 führt zunächst zu einer Reduktion auf 0,37 und wird durch SAG auf 1,0 angehoben, was einer 2,8-fachen Stimulation entspricht. sihDYRK1A#2 zeigt ebenfalls eine Reduktion (0,42). Mit SAG wird das Transkriptlevel auf 0,76 angehoben, also auf das 1,8-fache. Diese Induktion ist jedoch nicht signifikant höher als in den Kontrollzellen. Abbildung 4.8C zeigt einen Vergleich der DYRK1A-Proteinlevel einiger Zelllinien. Die Zelllysate wurden, wie in 3.2.3.3 beschrieben, angepasst. Die neuronalen Zelllinien DAOY (Spur 2) und T98G (Spur 6) zeigen die höchsten Level an DYRK1A Protein. HEK293T (Spur 3) zeigen auch ein hohes Level an DYRK1A, wohingegen SU.86.86 (Spur 5) ein sehr niedriges Level an DYRK1A aufweisen.

DYRK1A hat in den neuronalen Zelllinien einen klaren Einfluss auf den HH-Signalweg. In T98G wirkt DYRK1A als Stimulator auf den Signalweg. Dies wird klar durch eine gleichzeitige Herunterregulation von *GLI1* und *PTCH1* mit *DYRK1A* belegt. In unstimulierten DAOY-Zellen besitzt DYRK1A ebenfalls eine stimulierende Wirkung auf den HH-Signalweg. Auch hier wird sowohl *GLI1* sowie *PTCH1* zusammen mit *DYRK1A* herunterreguliert. Nach einer Stimulation der Zellen mit SAG und damit einem aktivierten HH-Signalweg scheint DYRK1A eher eine inhibitorische Funktion zu besitzen. Denn in Zellen mit einem *DYRK1A*-„Knockdown“ führt eine Stimulation zu einer höheren Gesamtmenge an GLI1-Transkript und damit HH-Aktivität. Dass ein *DYRK1A*-„Knockdown“ in den beiden neuronalen Zelllinien im Gegensatz zu den anderen

verwendeten Zelllinien einen klaren Effekt zeigt, kann zum einen an der Bedeutung von DYRK1A im neuronalen System, sowie auch an der generell hohen Menge an DYRK1A in diesen Zellen liegen, auch wenn HEK293T-Zellen ebenfalls ein hohes DYRK1A Level aufweisen.

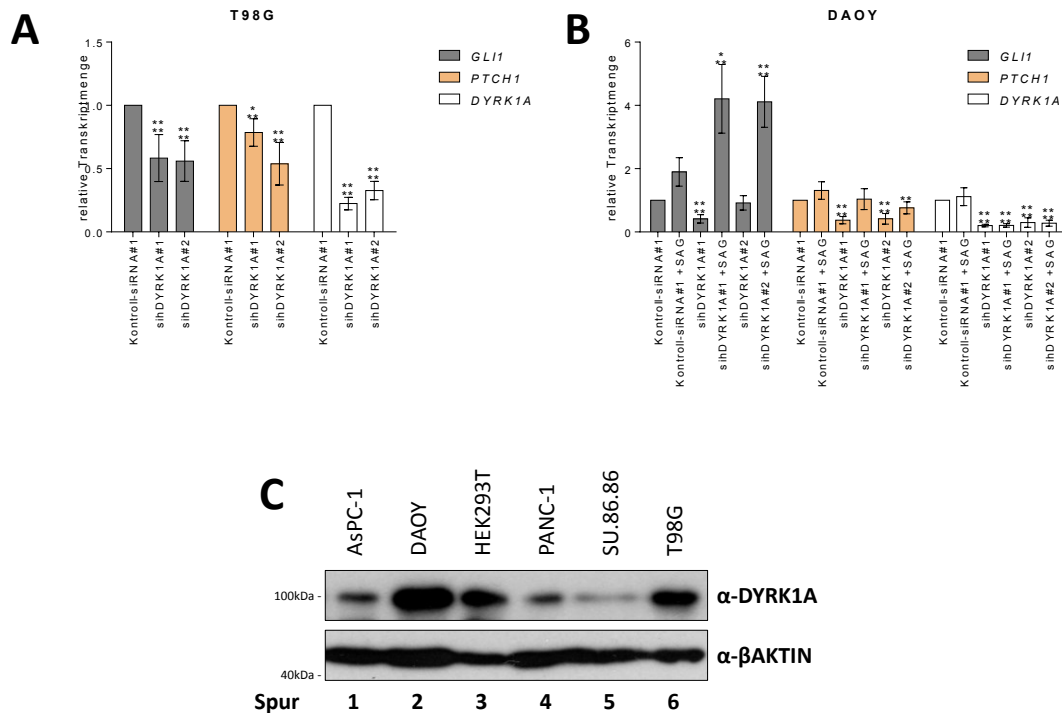


Abbildung 4.8: Depletion von DYRK1A beeinflusst die HH-Aktivität in neuronalen Tumorzellen. (A) Messung der Transkriptlevel von *GLI1*, *PTCH1* und *DYRK1A* nach *DYRK1A*-„Knockdown“ in T98G-Zellen. (B) Messung der Transkriptlevel von *GLI1*, *PTCH1* und *DYRK1A* nach *DYRK1A*-„Knockdown“ und Stimulation des HH-Signalwegs in DAOY-Zellen. (C) Vergleich der DYRK1A-Proteinlevel mittels Westernblot in AsPC-1, DAOY, HEK293T, PANC-1, SU.86.86 und T98G-Zellen. ****: $p < 0,0001$; ***: $p < 0,001$; **: $p < 0,01$; *: $p < 0,05$; signifikanter Unterschied zur Kontrollprobe ((A) Kontroll-siRNA#1; (B) Kontroll-siRNA#1 mit jeweiliger SAG-Behandlung); t-Test; (A) $n = 6-7$; (B) $n = 7$.

4.6 Stabile Überexpression von DYRK1A führt zu Verminderung der Signalwegsaktivität in *Sufu*^{-/-} und *Ptch1*^{-/-} MEFs

Da also möglicherweise eine höhere Menge an DYRK1A-Protein benötigt wird, um den HH-Signalweg zu beeinflussen, wurden Zellen kreiert, die DYRK1A stabil überexprimieren. Um alle Zustände des HH-Signalwegs abzudecken, wurden zum einen „Knockout“-Zellen für je einen der beiden negativen Regulatoren des Signalwegs SUFU und PTCH und zum anderen wurde eine Zelllinie mit einem „Knockout“ für SMO, dem Hauptaktivator des kanonischen HH-Signalwegs, verwendet. Stabile *Sufu*^{-/-}[V5-Leervektor], *Sufu*^{-/-}[DYRK1A-V5], *Ptch1*^{-/-}[V5-Leervektor] und *Ptch1*^{-/-}[DYRK1A-V5] wurden, wie unter (siehe 3.2.1.4.2) beschrieben, hergestellt. Die stabilen *Smo*^{-/-}[LacZ-V5] und *Smo*^{-/-}[DYRK1A-V5] lagen bereits im Labor vor. Die Zellen wurden ausgesät und bei voller Konfluenz auf Serum mit 1 % FBS gesetzt. 24 h später wurden die Zellen geerntet und die Transkriptlevel mittels quantitativer RT-PCR sowie die Proteinlevel mittels Westernblot analysiert.

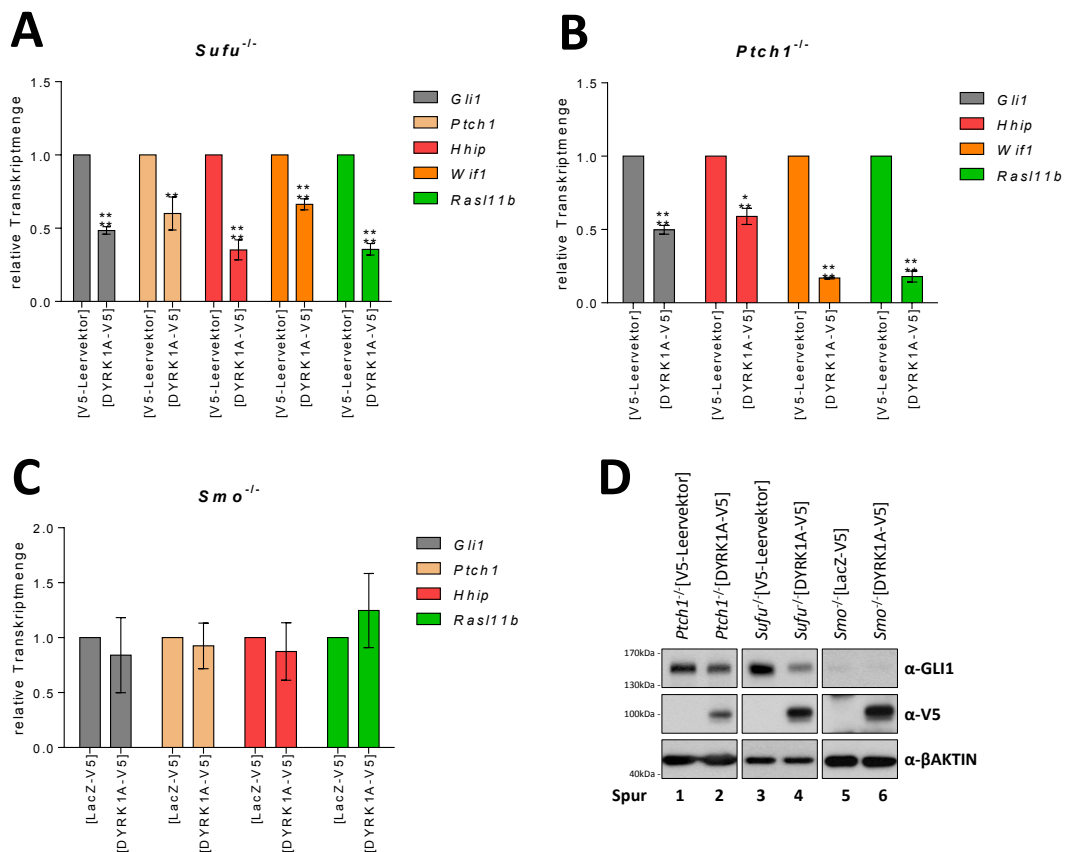


Abbildung 4.9: Stabile Überexpression von DYRK1A führt zu einer Inhibition der HH-Aktivität in MEF-Zellen mit aktivem HH-Signalweg, aber hat keinen Einfluss auf die basale Aktivität. (A) Messung der relativen Transkriptmenge von *Gli1*, *Ptch1*, *Hhip*, *Wif1* und *Rasl11b* in *Sufu*^{-/-}-Zellen mit stabiler Überexpression von DYRK1A-V5. (B) Messung der relativen Transkriptmenge von *Gli1*, *Hhip*, *Wif1* und *Rasl11b* in *Ptch1*^{-/-}-Zellen mit stabiler Überexpression von DYRK1A-V5. (C) Messung der relativen Transkriptmenge von *Gli1*, *Ptch1*, *Hhip* und *Rasl11b* in *Smo*^{-/-}-Zellen mit stabiler Überexpression von DYRK1A-V5. (D) Analyse der Proteinmengen von GLI1 und DYRK1A-V5 in den in (A), (B) und (C) verwendeten Zelllinien. βAKTIN dient als Ladekontrolle. ****: $p < 0,0001$; ***: $p < 0,001$; **: $p < 0,01$; *: $p < 0,05$; signifikanter Unterschied zur Kontrollprobe ((A, B) V5-Leervektor; (C) LacZ-V5); t-Test; (A, B) $n = 3$; (C) $n = 6$.

Sufu^{-/-}[DYRK1A-V5]-Zellen zeigten in allen gemessenen HH-Zielgenen eine deutliche Reduktion im Vergleich zu *Sufu*^{-/-}[V5-Leervektor]-Zellen (siehe Abbildung 4.9A). *Gli1*-Level wurden auf 0,48 und *Ptch1* auf 0,60 reduziert. *Wif1* (0,35), *Hhip* (0,66), ebenfalls bekannte Zielgene des HH-Signalwegs, und *Rasl11b* (0,36), einem mittels MicroArray ermittelten HH-Zielgen (Daten nicht gezeigt), waren auf mRNA-Ebene im Vergleich zu den Kontrollzellen ähnlich stark reduziert. *Ptch1*^{-/-}[DYRK1A-V5] zeigten ein ähnliches Bild (siehe Abbildung 4.9B). Die Transkription der Zielgene *Gli1* (0,50), *Hhip* (0,59), *Wif1* (0,17) und *Rasl11b* (0,18) war auch hier stark reduziert. *Ptch1* konnte hier analog zu Abbildung 4.7B nicht gemessen werden. Im Gegensatz dazu konnte für keines der Zielgene *Gli1*, *Ptch1*, *Hhip* und *Rasl11b* in den *Smo*^{-/-}[DYRK1A-V5]-Zellen ein signifikanter Unterschied zu den *Smo*^{-/-}[LacZ-V5]-Zellen gemessen werden (siehe Abbildung 4.9C). *Wif1* mRNA konnte in keiner der beiden Zelllinien gemessen werden. Um die Expression des Konstruktes zu überprüfen, wurden Gesamtzellextrakte der sechs Zelllinien hergestellt und

mittels Westernblot analysiert. Mittels des V5-Tags konnte das Vorhandensein von DYRK1A-V5 in allen drei Zelllinien, die stabil mit DYRK1A-V5 transfiziert wurden, nachgewiesen werden (siehe Abbildung 4.9D, Spur 2, 4 und 6). Keine der drei Kontrollzelllinien zeigte eine Bande mit einem α -V5-Antikörper auf der Höhe von DYRK1A (siehe Abbildung 4.9D, Spur 1, 3 und 5). Wie auf Transkriptebeine zeigen *Ptch1*^{-/-}[DYRK1A-V5] (Spur 2) beziehungsweise *Sufu*^{-/-}[DYRK1A-V5] (Spur 4) ein geringeres Level für GLI1 auf Proteinebene als die zugehörigen Kontrollen (Spuren 1 und 3). *Smo*^{-/-}-Zellen zeigen diesen Unterschied nicht zwischen den beiden Zelllinien (Spur 5 und 6). Zellen, die stabil mit DYRK1A transfiziert wurden, zeigen kein verändertes Prozessieren von GLI3 (siehe Abbildung 6.3).

Die stabile Überexpression von DYRK1A in Zellen mit aktivem Hedgehog-Signalweg führt zu einer Inhibition des HH-Signalwegs. In Zellen mit inaktivem HH-Signal scheint die Überexpression von DYRK1A keinen Einfluss auf die HH-Aktivität zu haben.

4.7 FGF-2 inhibiert den HH-Signalweg

2006 wurde eine Aktivierung von GLI1 durch FGF-2 im Luziferaseassay beschrieben, die den N-Terminus von GLI1 benötigt (Riobo et al., 2006a). Im Gegensatz dazu wurde gezeigt, dass FGF-2 die durch SHH aktivierte Proliferation von granulären neuronalen Vorläuferzellen inhibiert (Emmenegger et al., 2013). Zwei Ergebnisse, die zunächst widersprüchlich scheinen, aber ähnlich den beobachteten Effekten durch DYRK1A sind. Denn auch die Kinase zeigt in verschiedenen Zellen und Experimenten sowohl stimulierende (siehe Abbildung 4.1; Abbildung 4.2; Abbildung 4.3; Abbildung 4.5A; Abbildung 4.8A) als auch hemmende (siehe Abbildung 4.8B, Abbildung 4.9) Auswirkungen auf den HH-Signalweg. Außerdem wurde eine Tyrosinphosphorylierung von DYRK1A nach Behandlung von Zellen mit FGF-2 beobachtet (Kottakis et al., 2011). Möglicherweise ist DYRK1A ein Mediator zwischen dem FGF- und HH-Signalweg.

Um zunächst die Stimulation von GLI1 durch FGF-2 zu bestätigen, wurden NIH3T3-Zellen mit dem 12xGliLuc-Reporter und pSV-R zur Normalisierung transfiziert. Zusätzlich wurden die Zellen entweder mit GLI1-Flag, GLI1 Δ N-Flag oder dem Leervektor transfiziert und für 24 h mit 10 ng/ μ l FGF-2 behandelt. Abbildung 4.10 zeigt die Ergebnisse des Luziferaseexperimentes. Der Leervektor zeigt generell im Vergleich zu GLI1-Flag und GLI1 Δ N-Flag ein geringes Level an Luziferaseaktivität (siehe Abbildung 4.10A). Auch hier zeigt sich bereits eine Erhöhung der Luziferaseaktivität durch FGF-2 um den Faktor 10 (siehe Abbildung 4.10B). GLI1-Flag führt zu einer 190-fachen Erhöhung der Luziferaseaktivität (siehe Abbildung 4.10A). Die Behandlung mit FGF-2 führt zu einer weiteren Erhöhung der Luziferaseaktivität. Die reine Veränderung durch FGF-2 ist allerdings nur 5,8-fach und damit geringer als in den Kontrollansätzen, auch wenn

dieser Unterschied nur im Vergleich zu GLI1ΔN-Flag signifikant ist (siehe Abbildung 4.10B). GLI1ΔN-Flag führt ebenfalls zu einer Erhöhung der Luziferaseaktivität im Vergleich zum Leervektor um das 84-fache (siehe Abbildung 4.10A). Die reine Induktion durch FGF liegt mit 9,4-fach auf dem Niveau der Kontrollansätze (siehe Abbildung 4.10B)

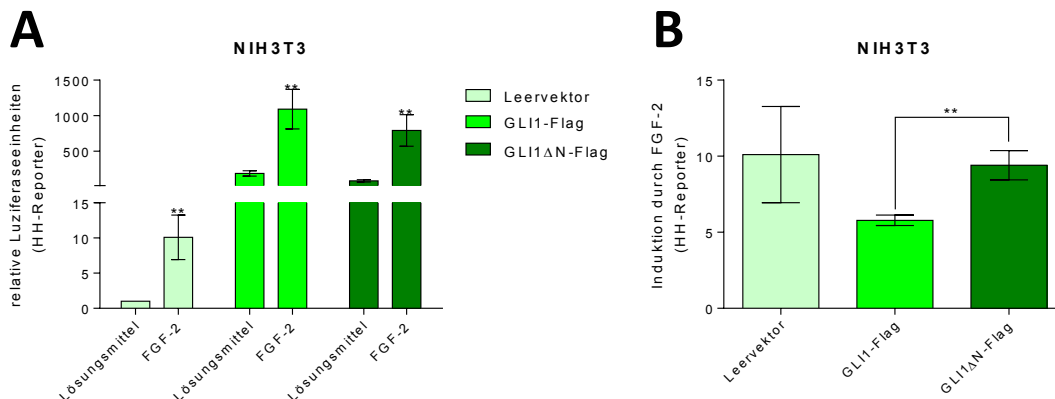


Abbildung 4.10: Einfluss von FGF-2 auf den HH-Signalweg im Luziferaseexperiment. (A) Luziferaseexperiment mit dem HH-Reporter 12xGliLuc und NIH3T3-Zellen. Die Zellen wurden mit GLI1-Flag, GLI1ΔN-Flag oder einem Leervektor transfiziert und für 24 h mit 10 ng/μl FGF-2 stimuliert. (B) Vergleich der reinen Induktion durch FGF-2 der in (A) gezeigten Zellen. ****: $p < 0,0001$; ***: $p < 0,001$; **: $p < 0,01$; *: $p < 0,05$; signifikanter Unterschied zur Kontrollprobe ((A) Lösungsmittel mit jeweiligem GLI1-Konstrukt; (B) Leervektor); t-Test; $n = 3$.

Die Induktion des GLI1 durch FGF-2 im Luziferaseexperiment konnte nicht gezeigt werden, der HH-Reporter wird zwar generell aktiviert. Allerdings sowohl in An- als auch in Abwesenheit von GLI1. Die reine Induktion durch FGF-2 ist in Anwesenheit von GLI1 dabei sogar geringer als mit GLI1ΔN.

Um zu überprüfen, ob FGF-2 die gleichen Auswirkungen auf andere Reporter zeigt, wurden NIH3T3-Zellen mit verschiedenen Reporter-Gen-Konstrukten und pSV-R zu Normalisierung transfiziert beziehungsweise Shh-LIGHT2-Zellen mit stabil integriertem HH-Luziferasereporter verwendet und für verschiedene Zeitspannen bis zu 48 h mit FGF-2 behandelt. Ein Reporter-Gen-Plasmid mit einem Promoter aus dem SRE zeigte bei Behandlung mit FGF-2 nach 2 h bereits eine Induktion und nach 4 h Behandlung mit dem 7,8-fachen des Ausgangswertes ein Maximum an Induktion. Nach 6 h, 8 h und 12 h sank diese Induktion ab, bis sie nach 24 h ihr Ausgangsniveau erreichte und auch nach 48 h nicht mehr anstieg (siehe Abbildung 4.11A). Shh-LIGHT2-Zellen zeigten einen ähnlichen Verlauf (siehe Abbildung 4.11B). Ebenfalls nach 4 h erreichten sie ein Maximum an Luziferaseaktivität (4,1-facher Ausgangswert), die absank, bis sie nach 24 h schließlich ihren Ausgangswert erreicht hatte. Nach 48 h zeigte sich ein erneuter Anstieg der Luziferaseaktivität. Die transiente Transfektion des 12xGliLuc-Reporters zeigte ebenfalls einen zeitabhängigen Anstieg der Luziferaseaktivität (siehe Abbildung 4.11C), allerdings erst nach 24 h (4,2-fach) und 48 h (7,3-fach). Mit Verwendung des 8xGliLuc-Reporters ergab sich ein ähnliches Bild mit einem Maximum an Induktion nach 24 h (7,8-fach). Nach 48 h

war diese Luziferaseaktivität immer noch deutlich erhöht (6,3-fach) (siehe Abbildung 4.11D). Der 8xmut.Gli-Reporter besitzt mutierte Bindestellen für GLI, so dass GLI-Transkriptionsfaktoren nicht mehr binden können. Er dient damit als Negativkontrolle für die 8xGliLuc-Reporter und sollte bei einer GLI- und damit HH-abhängigen Transkription keine Induktion zeigen. Wie in Abbildung 4.11E zu erkennen, zeigt dieser Reporter eine vergleichbare Induktion durch Behandlung mit FGF-2 wie 8xGliLuc mit einer Induktion nach 24 h (4,2-fach) und 48 h (5,0-fach). Die Verechnung dieser beiden Reporterkonstrukte ergibt keinen signifikanten Anstieg der Luziferaseaktivität (siehe Abbildung 4.11F). Analoge Experimente mit kotransfiziertem GLI1-Flag zeigen vergleichbare Resultate (siehe Abbildung 6.4).

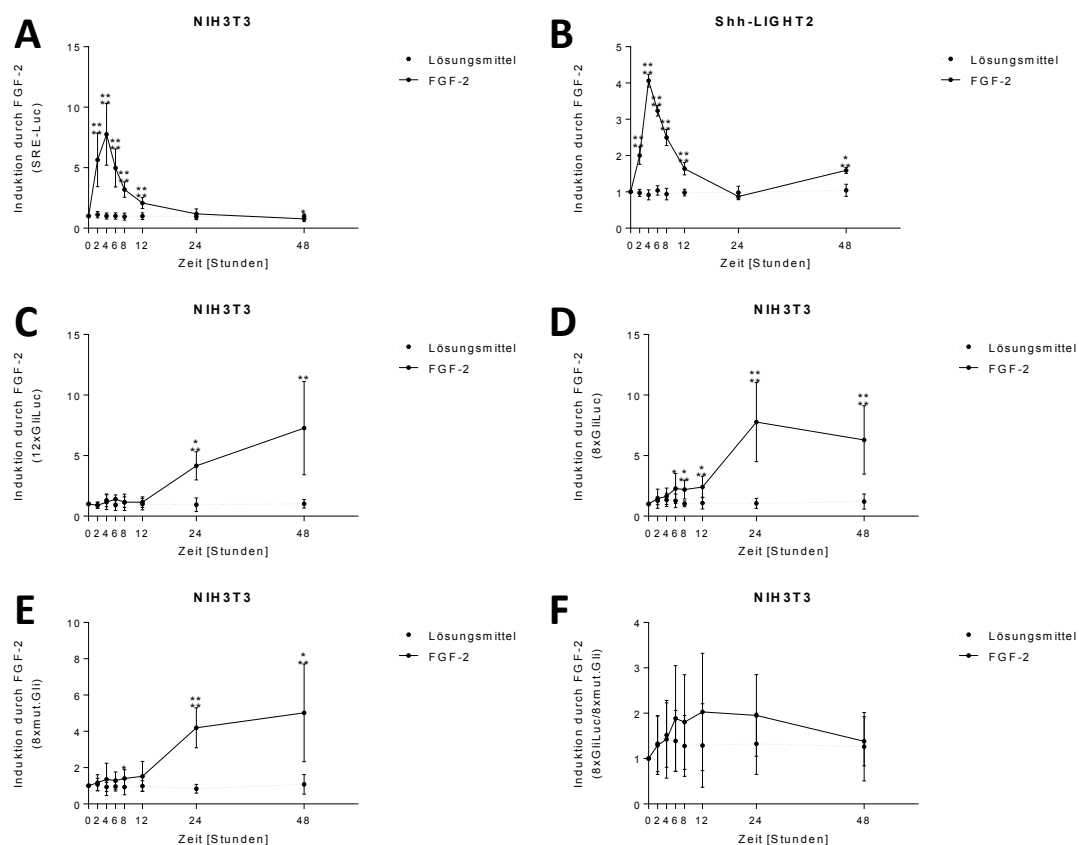


Abbildung 4.11: Zeitabhängiger Einfluss von FGF-2 auf verschiedene Reporter im Luziferaseexperiment. (A) Einfluss auf den SRE-Reporter SRE-Luc nach 0 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h, 24 h oder 48 h Behandlung mit 10 ng/μl FGF-2 in NIH3T3-Zellen. (B) Einfluss auf die Luziferaseaktivität von Shh-LIGHT2-Zellen nach 0 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h, 24 h oder 48 h Behandlung mit 10 ng/μl FGF-2. (C) Einfluss auf den HH-Reporter 12xGliLuc nach 0 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h, 24 h oder 48 h Behandlung mit 10 ng/μl FGF-2 in NIH3T3-Zellen. (D) Einfluss auf den HH-Reporter 8xGliLuc nach 0 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h, 24 h oder 48 h Behandlung mit 10 ng/μl FGF-2 in NIH3T3-Zellen. (E) Einfluss auf den HH-Reporter 8xmut.Gli nach 0 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h, 24 h oder 48 h Behandlung mit 10 ng/μl FGF-2 in NIH3T3-Zellen. (F) Verechnung der Luziferaseaktivitäten von 8xGliLuc (D) und 8xmut.Gli (E). ****: $p < 0,0001$; ***: $p < 0,001$; **: $p < 0,01$; *: $p < 0,05$; signifikanter Unterschied zur Kontrollprobe (Lösungsmittel zu jeweiligem Zeitpunkt); t-Test; (A, D, E, F) $n = 10$; (B) $n = 5-6$; (C) $n = 6$.

Der SRE-getriebene Luziferaseexpression zeigt die Aktivierung durch FGF-2 als Positivkontrolle. Die Steigerung der Luziferaseaktivität bei der Verwendung von GLI-abhängigen Promotern scheint ein unspezifischer Effekt zu sein. FGF-2 scheint Signalwege zu aktivieren, die den in allen

Konstrukten enthaltenen Minimalpromotor aktivieren. Um dieses Ergebnis zu bestätigen und ein System zu haben, dass weniger anfällig für eine solche unspezifische Aktivierung ist, wurden NIH3T3-Zellen erneut mit FGF-2 behandelt und mittels quantitativer RT-PCR analysiert.

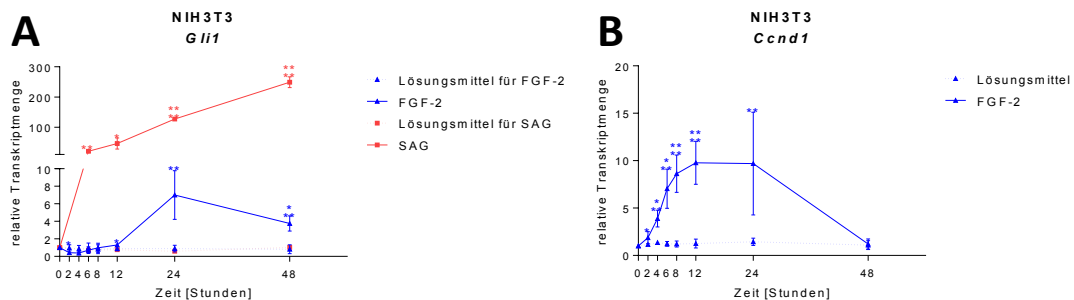


Abbildung 4.12: Einfluss von FGF-2 auf die Transkriptlevel von *Gli1*. (A) Messung der relativen Transkriptmenge von *Gli1* nach 0 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h, 24 h und 48 h Behandlung mit 10 ng/μl FGF-2 oder 6 h, 12 h, 24 h oder 48 h mit 100 nM SAG. (B) Messung der relativen Transkriptmenge von *Ccnd1* nach 0 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h, 24 h und 48 h Behandlung mit 10 ng/μl FGF-2. ****: $p < 0,0001$; ***: $p < 0,001$; **: $p < 0,01$; *: $p < 0,05$; signifikanter Unterschied zur Kontrollprobe (jeweiliges Lösungsmittel zu jeweiligem Zeitpunkt); t-Test; (FGF-2 in (A) und (B)) $n = 5$; (SAG in (A)) $n = 3$.

Wie Abbildung 4.12A zeigt, führt die Behandlung von NIH3T3-Zellen mit FGF-2 nach 24 h in diesem System zu einer Erhöhung der Transkriptmenge von *Gli1*. Dieser Anstieg nach 24 h (7,0-fach) und 48 h (3,8-fach) ist wesentlich geringer als der, der durch SAG induziert werden kann. Dieser beträgt nach 6 h bereits das 21-fache des Ausgangswertes und steigt nach 12 h (47-fach), 24 h (130-fach) und 48 h (250-fach) noch weiter an. *Ccnd1* als Positivkontrolle für die Wirkung von FGF-2 zeigt einen Anstieg bereits nach 12 h, wobei ein Maximum mit dem 9,8-fachen des Ausgangswertes erreicht wird und bis 48 h nach Stimulation wieder auf den Ausgangswert zurückfällt (siehe Abbildung 4.12B).

Die Induktion von *Gli1* durch FGF-2 ist mit quantitativer qPCR messbar. FGF-2 hat einen Einfluss auf die Aktivierung des HH-Signalwegs. Allerdings ist diese Aktivierung sehr gering. Möglicherweise ist das auch der Grund, weshalb die Luziferaseexperimente keine spezifischen Aktivierungen durch FGF-2 zeigen. Als nächstes sollte untersucht werden, welchen Effekt FGF-2 bei bereits aktiviertem HH-Signalweg besitzt.

Um dies zu untersuchen, wurden Shh-LIGHT2 Zellen mit SAG, FGF-2 oder der Kombination aus beiden für 24 h behandelt und anschließend die Luziferaseaktivität gemessen. Die Behandlung mit SAG für 24 h führte zu einer 9,7-fachen Steigerung der Luziferaseaktivität in 10 % FBS-haltigem Medium (siehe Abbildung 4.13A) beziehungsweise einer 15-fachen Steigerung in Medium mit 1 % FBS (siehe Abbildung 4.13B). Die Behandlung von Shh-LIGHT2-Zellen mit FGF-2 alleine hatte nach 24 h keinen Einfluss auf die Luziferaseaktivität mit 10 % oder 1 % FBS. Die Behandlung mit SAG in Kombination mit FGF-2 führte zu einer fast vollständigen Aufhebung der

Induktion mit SAG alleine. In 10 % FBS blieb von der 9,7-fachen Induktion lediglich eine 1,4-fache Induktion übrig. In 1 % FBS fiel die Induktion von 15-fach auf ebenfalls 1,4-fach.

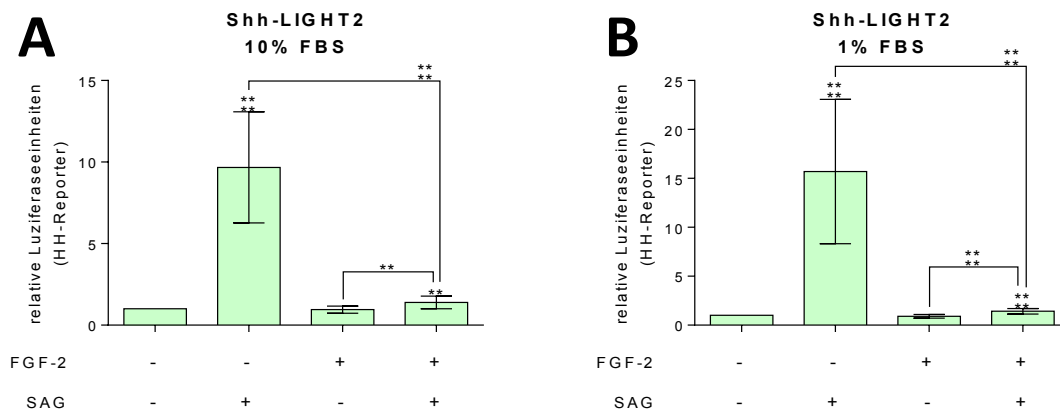


Abbildung 4.13: FGF-2 inhibiert die SAG-vermittelte Erhöhung der Luziferaseaktivität in Shh-LIGHT2-Zellen. (A) Luziferaseexperiment mit Shh-LIGHT2-Zellen. Die Zellen wurden für 24 h mit 100 nM SAG, 10 ng/μl FGF-2 oder der Kombination aus beiden behandelt. (B) Die Zellen wurden wie in (A) beschrieben behandelt, allerdings 24 h vor Stimulation auf Serum mit 1 % FBS gesetzt. ****: $p < 0,0001$; ***: $p < 0,001$; **: $p < 0,01$; *: $p < 0,05$; signifikanter Unterschied zur Kontrollprobe (ohne FGF-2 und SAG); t-Test; (A) $n = 12$; (B) $n = 11$.

Im Luziferaseexperiment führt eine Behandlung von Zellen mit FGF-2 zu einer fast vollständigen Inhibition der SAG-gesteuerten HH-Aktivierung. Um diese Ergebnisse zu bestätigen, wurden *Sufu*^{-/-}- und *Ptch1*^{-/-}-Zellen mit FGF-2 behandelt und mittels quantitativer RT-PCR analysiert.

In *Sufu*^{-/-}-Zellen zeigt sich eine Reduktion aller gemessenen Zielgene nach 24 h Behandlung mit FGF-2. Die *Gli1*-Transkriptlevel fallen auf 0,40, *Ptch1* auf das 0,32-fache, *Hhip* auf das 0,47-fache, *Wif1* auf das 0,23-fache und *Ras1b* auf das 0,22-fache des Ausgangswertes ohne FGF-2 Behandlung (siehe Abbildung 4.14A). *Ptch1*^{-/-}-Zellen zeigen ebenfalls eine Reduktion der gemessenen Zielgene *Gli1* (0,27), *Hhip* (0,85), *Wif1* (0,11) und *Ras1b* (0,21) (siehe Abbildung 4.14B).

Behandlung von Zellen mit aktivem HH-Signalweg für 24 h mit FGF-2 führt zu einer deutlichen Reduktion der HH-Aktivität sowohl in Luziferaseexperimenten, sowie auch auf Transkriptebene. FGF-2 führt ebenfalls zu einer Verminderung der Zellen mit Primärzilium (siehe Abbildung 6.5). Allerdings kann die Inhibition der Zielgenexpression durch FGF-2 dadurch nicht erklärt werden, da diese auch in *Sufu*^{-/-}-Zellen auftritt. Diese Zellen benötigen für die Aufrechterhaltung der HH-Aktivität kein Primärzilium (Chen et al., 2009). Die beobachtete Inhibition des HH-Signalwegs durch FGF-2 muss also unabhängig vom Primärzilium sein und lässt sich nicht alleine durch den Abbau der Zilien, der wahrscheinlich durch den proliferativen Stimulus von FGF-2 (Gospodarowicz, 1974) hervorgerufen wird, erklären.

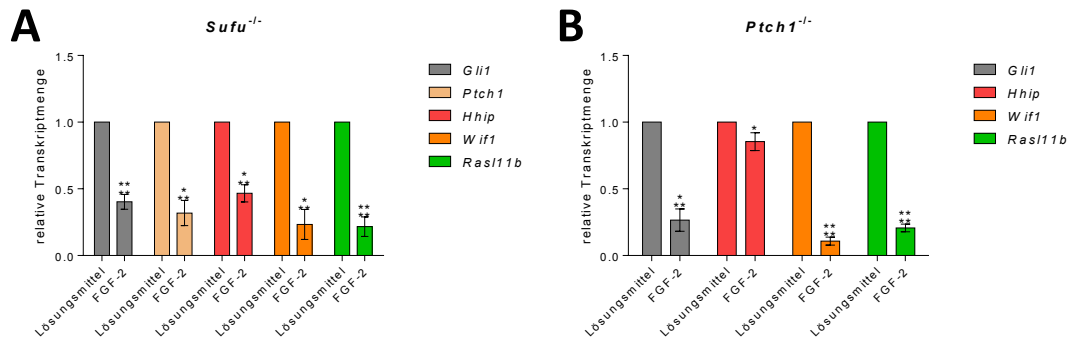


Abbildung 4.14: FGF-2 vermindert die Zielgentranskription bei aktivem HH-Signalweg. (A) Bestimmung der relativen Transkriptmenge der HH-Zielgene *Gli1*, *Ptch1*, *Hhip*, *Wif1* und *Rasl11b* in *Sufu*^{-/-}-Zellen mit und ohne Behandlung von 10 ng/μl FGF-2 für 24 h. (B) Bestimmung der relativen Transkriptmenge der HH-Zielgene *Gli1*, *Hhip*, *Wif1* und *Rasl11b* in *Ptch1*^{-/-}-Zellen mit und ohne Behandlung von 10 ng/μl FGF-2 für 24 h. ****: $p < 0,0001$; ***: $p < 0,001$; **: $p < 0,01$; *: $p < 0,05$; signifikanter Unterschied zur Kontrollprobe (Lösungsmittel); t-Test; (A) $n = 3$; (B) $n = 2-3$.

4.8 Die Effekte von FGF-2 auf den HH-Signalweg sind nicht durch DYRK1A vermittelt

Da FGF-2 zu einer Tyrosinphosphorylierung von DYRK1A führt und damit wahrscheinlich die Aktivität der Kinase reguliert, liegt die Vermutung nahe, dass diese Inhibition durch DYRK1A vermittelt werden könnte (vergleiche Abbildung 4.9A, B). Dazu wurden die obigen Experimente wiederholt und die Zellen zusätzlich mit Harmin behandelt.

Abbildung 4.15A zeigt ein Luziferaseexperiment mit Shh-LIGHT2-Zellen. Die Zellen wurden für 24 h mit SAG, FGF-2 und Harmin behandelt und anschließend die Luziferaseaktivität bestimmt. Die Stimulation mit SAG führte dabei zu einer 38-fachen Erhöhung der Luziferaseaktivität und zusätzliche Stimulation mit FGF-2 war in der Lage, diese Erhöhung komplett zu verhindern. Die Zugabe von Harmin zu SAG und FGF-2 führte zu einer leichten Erhöhung auf das 3,3-fache des Ausgangswertes. Harmin scheint also einen minimalen Einfluss auf die FGF-2-vermittelte Inhibition der SAG-vermittelten Stimulation des HH-Signalwegs zu haben. Im Vergleich zur Gesamtstimulation ist dieser Effekt aber wohl vernachlässigbar.

Die in der quantitativen RT-PCR beobachteten Effekte von FGF-2 wurden ebenfalls untersucht. Dazu wurden NIH3T3, *Sufu*^{-/-} und *Ptch1*^{-/-}-Zellen für 24 h mit FGF-2, Harmin oder der Kombination aus beiden behandelt. Anschließend wurden mittels quantitativer RT-PCR HH-Zielgene bestimmt. In NIH3T3-Zellen (siehe Abbildung 4.15B) wurde durch FGF-2 eine Erhöhung von der *Gli1*-Transkriptmenge um das 2,1-fache gemessen. *Ptch1* wurde auch erhöht, und zwar ebenfalls um den Faktor 2,1. Die alleinige Zugabe von Harmin hatte weder auf die Transkriptmengen von *Gli1* noch von *Ptch1* einen signifikanten Einfluss im Vergleich zu den Kontrollzellen. Die Kombination aus FGF-2 zusammen mit Harmin führt zu einer Erhöhung der Transkriptmengen um das 2,9-fache für *Gli1*, beziehungsweise das 3,2-fache für *Ptch1*. Beide

Werte sind signifikant höher, als die für FGF-2 alleine. *Sufu*^{-/-}-Zellen (siehe Abbildung 4.15C) zeigten durch die Behandlung mit FGF-2 eine signifikante Verminderung der Zielgene *Gli1* (0,082), *Ptch1* (0,10) und *Ptch2* (0,18). Die Behandlung mit Harmin alleine hatte keinen signifikanten Einfluss auf die gemessenen Zielgene. Die Kombination aus Harmin und FGF-2 führte ebenfalls bei allen drei Zielgenen zu einer signifikanten Reduktion (*Gli1*: 0,11; *Ptch1*: 0,20; *Ptch2*: 0,34). Die Werte von *Ptch1* und *Ptch2* sind dabei signifikant höher als die nach einer Behandlung mit FGF-2 alleine. *Ptch1*^{-/-}-Zellen zeigen ebenfalls eine Verminderung der Transkriptlevel von *Gli1* und *Ptch2* auf 0,27 und 0,36 (siehe Abbildung 4.15D). Die Behandlung mit Harmin alleine führt im Falle von *Gli1* zu einer signifikanten Verminderung auf 0,87. *Ptch2* wird nicht signifikant beeinflusst. Die Kombination beider Reagenzien zeigt eine Verminderung der beiden Zielgene auf 0,29 für *Gli1* und 0,43 für *Ptch2* diese Verminderungen sind nicht signifikant höher als die der Behandlung mit FGF-2 alleine.

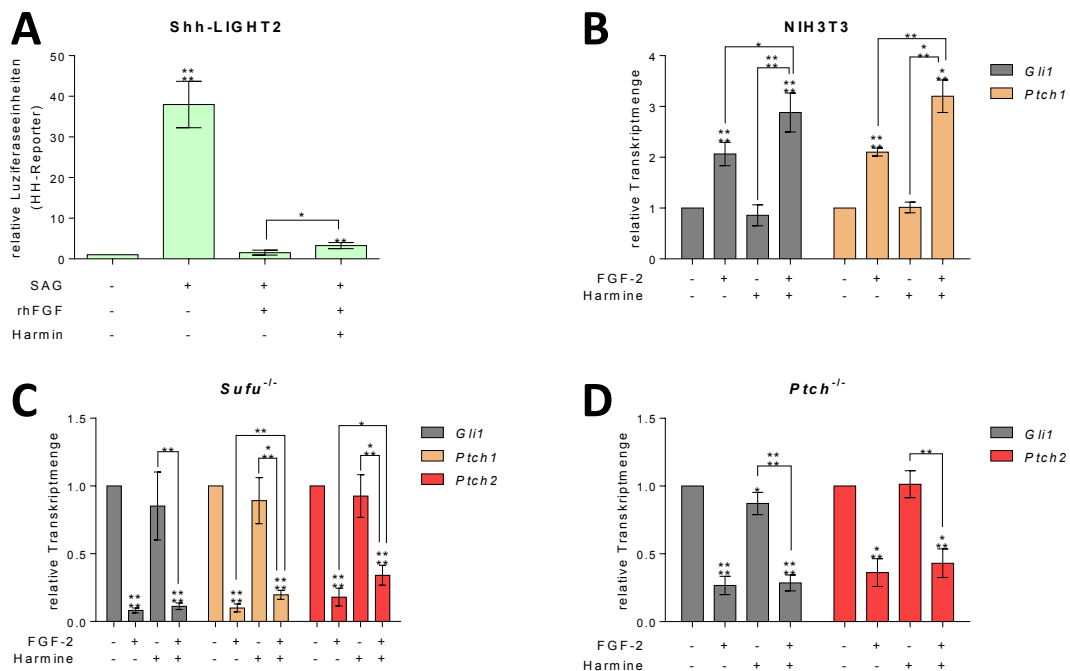


Abbildung 4.15: Einfluss von Harmin auf die FGF-2-vermittelten Effekte auf den HH-Signalweg. (A) Luziferaseexperiment mit Shh-LIGHT2-Zellen. Die Zellen wurden für 24 h mit 100 nM SAG, SAG und 10 ng/μl FGF-2 oder SAG, FGF-2 und 5 μM Harmin behandelt. (B) NIH3T3-Zellen wurden für 24 h mit 10 ng/μl FGF-2, 5 μM Harmin oder der Kombination aus beiden behandelt. Anschließend wurden die relativen Transkriptmengen für *Gli1* und *Ptch1* bestimmt. (C) *Sufu*^{-/-}-Zellen wurden für 24 h mit 10 ng/μl FGF-2, 5 μM Harmin oder der Kombination aus beiden behandelt. Anschließend wurden die relativen Transkriptmengen für *Gli1*, *Ptch1* und *Ptch2* bestimmt. (D) *Ptch1*^{-/-}-Zellen wurden für 24 h mit 10 ng/μl FGF-2, 5 μM Harmin oder der Kombination aus beiden behandelt. Anschließend wurden die relativen Transkriptmengen für *Gli1* und *Ptch2* bestimmt. ****: $p < 0,0001$; ***: $p < 0,001$; **: $p < 0,01$; *: $p < 0,05$; signifikanter Unterschied zur Kontrollprobe (ohne FGF-2, Harmin und SAG); t-Test; $n = 3-4$.

Die Inhibition von DYRK1A durch Harmin hat in einigen Fällen einen minimalen Einfluss auf die durch FGF-2 vermittelten Effekte auf den HH-Signalweg. Allerdings sind diese Effekte so gering, dass sie nicht als Erklärung für die großen Einflüsse von FGF-2-vermittelten Effekte auf den HH-

Signalweg dienen können. Trotz der teilweise vorhandenen statistischen Signifikanz sind diese Effekte so gering, dass ihre Relevanz für biologische Systeme sehr fraglich ist.

4.9 DYRK1A interagiert mit und phosphoryliert ABLIM1

Um die Funktion von DYRK1A im HH-Signalweg weiter zu charakterisieren, wurde in einem *in vitro* Kinase Screen nach weiteren möglichen Targets der Kinase gesucht (P. Holz). Ein vielversprechendes Zielprotein war ABLIM1 (siehe Abbildung 4.16A), ein Interaktionspartner des AKTIN-Zytoskeletts (Roof et al., 1997). Auch für DYRK1A wurde bereits gezeigt, dass es das AKTIN-Zytoskelett beeinflusst (Dowjat et al., 2012; Liu et al., 2009; Martinez de Lagran et al., 2012; Park et al., 2012). Um die Interaktion zwischen ABLIM1 und DYRK1A zu bestätigen, wurde ein Koimmunpräzipitationsexperiment

durchgeführt. Dazu wurden HEK293T-Zellen mit V5-getaggtm DYRK1A, Flag-getaggtm ABLIM1 oder der Kombination aus beiden Proteinen transfiziert. Aus den gewonnenen Lysaten wurde mittels eines α -V5-Antikörpers DYRK1A-V5 präzipitiert und das Präzipitat mittels eines α -Flag-Antikörpers nach ABLIM1-Flag untersucht (siehe Abbildung 4.16B). Die Gesamtzellextrakte zeigen eine Expression der einzelnen Proteine in den gewünschten Proben. DYRK1A-V5 wird in allen Proben, in denen es vorhanden ist spezifisch präzipitiert (Spur 1, 3). ABLIM1-Flag wird nur in Kombination mit DYRK1A-V5 präzipitiert (Spur 3) und nicht alleine (Spur 2).

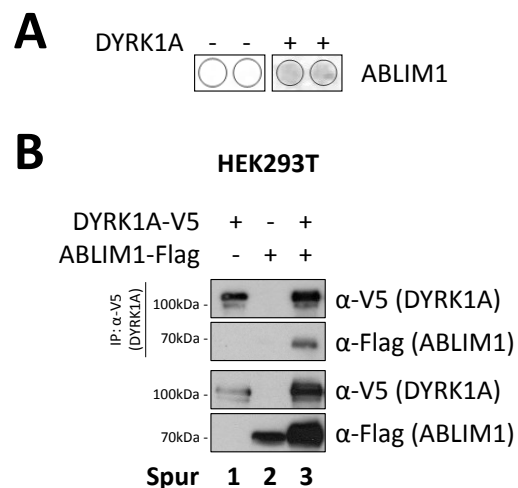


Abbildung 4.16: DYRK1A interagiert mit und phosphoryliert ABLIM1.

(A) *in vitro* Kinase Assay mit rekombanantem DYRK1A und rekombanantem ABLIM1. DYRK1A phosphoryliert ABLIM1 (P. Holz). (B) Koimmunpräzipitation von ABLIM1 mit DYRK1A. HEK293T-Zellen wurden mit DYRK1A-V5, ABLIM1-Flag oder der Kombination aus beiden transfiziert. DYRK1A wurde mittels eines α -V5-Antikörpers präzipitiert und anschließend die Präzipitate im Westernblot analysiert.

ABLIM1-Flag kann mit DYRK1A-V5 kopräzipitiert werden. Die beiden Proteine zeigen in dem hier gezeigten Zellsystem eine Interaktion. Beide ABLIM-Proteine zeigen nach Kotransfektion mit DYRK1A und einer Analyse mittels Westernblot ein verändertes Laufverhalten (siehe Abbildung 6.6). Zusammen mit der *in vitro* beobachteten Phosphorylierung von ABLIM1 durch DYRK1A kann davon ausgegangen werden, dass DYRK1A ABLIM1 direkt phosphorylieren kann.

4.10 DYRK1A zerstört das AKTIN-Zytoskelett

Die Verbindung zwischen dem AKTIN-Zytoskelett und DYRK1A ist schon seit längerem bekannt. Es wurde bereits gezeigt, dass DYRK1A negativen Einfluss auf die Stabilität des AKTIN-

Zytoskeletts hat (Dowjat et al., 2012; Liu et al., 2009; Martinez de Lagran et al., 2012; Park et al., 2012). Um zu überprüfen, ob sich dieser Effekt auch in den hier verwendeten Zellen zeigt, wurden zum einen stabil mit DYRK1A-V5 transfizierte NIH3T3-Zellen und Kontrollzellen verwendet und aus diesen das gesamte AKTIN in G- und F-AKTIN fraktioniert (siehe 3.2.3.6). Die Funktionalität der Methode wurde zunächst überprüft und bestätigt (siehe Abbildung 6.7A). Die beiden Zelllinien NIH3T3[DYRK1A-V5] und NIH3T3[V5-Leervektor] zeigten unter normalen Bedingungen nur eine kaum messbare Menge an F-AKTIN, was einen Vergleich der beiden Verhältnisse annähernd unmöglich machte (siehe Abbildung 4.17A, Spuren 1-4). Um das ganze System in Richtung F-AKTIN zu verschieben, wurden die Zellen vor der Fraktionierung mit 10 nM Jasplakinolid behandelt. Dieses Reagenz führt zur Stabilisierung von F-AKTIN. Um nicht in eine Sättigung der F-AKTIN-Menge zu geraten, wurde lediglich ein Zehntel der Konzentration des Testversuches (siehe Abbildung 6.7A) eingesetzt. Nach der Behandlung und der anschließenden Fraktionierung zeigte sich in den NIH3T3[DYRK1A-V5]-Zellen eine im Vergleich zu NIH3T3[V5-Leervektor] stark verminderte Menge an F-AKTIN. In den Kontrollzellen zeigte sich ein Verhältnis von F-AKTIN zu G-AKTIN von 0,82. In NIH3T3[DYRK1A-V5]-Zellen betrug dieses Verhältnis lediglich 0,30 (Spuren 5-8).

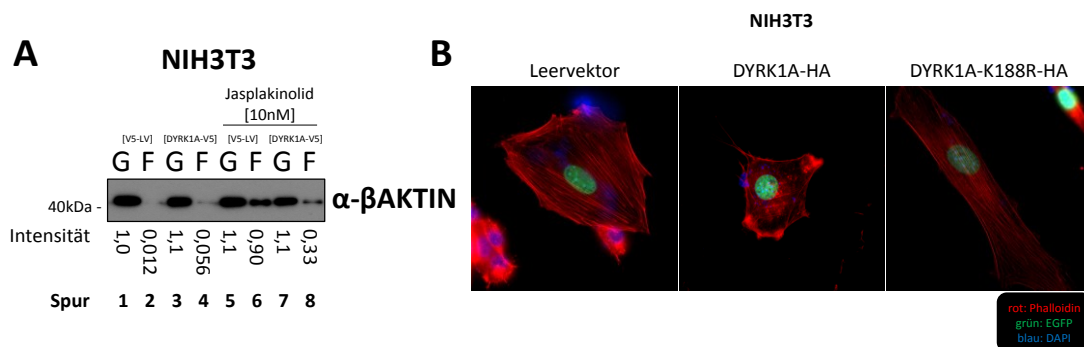


Abbildung 4.17: DYRK1A destabilisiert das AKTIN-Zytoskelett. (A) NIH3T3[V5-Leervektor] und NIH3T3[DYRK1A-V5] wurden für 30 min mit Solvens oder 10 nM Jasplakinolid behandelt. Anschließend wurden F- und G-AKTIN voneinander getrennt und die Fraktionen mittels Westernblot analysiert. Die Banden wurden mittels GELQuantNET quantifiziert. Blot und Quantifizierung sind stellvertretend für zwei unabhängige Experimente. (B) Texas Red-Phalloidininfärbung von NIH3T3-Zellen, die transient mit H2B-EGFP in Kombination mit DYRK1A-HA, DYRK1A-K188R-HA oder einem Leervektor transfiziert wurden. Phalloidin ist in rot, EGFP in grün und die Gegenfärbung der Kerne mit DAPI in blau gezeigt.

Um die obigen Ergebnisse mittels Fluoreszenzmikroskopie zu bestätigen, wurden NIH3T3-Zellen mit DYRK1A-HA, DYRK1A-K188R-HA oder einem Leervektor transfiziert. Zusätzlich wurden die Zellen mit H2B-EGFP kotransfiziert, um transfizierte Zellen zu erkennen. Die Zellen wurden nach ihrer Fixierung zusätzlich mit einem Texas Red-Phalloidin Konjugat angefärbt, um spezifisch das F-AKTIN-Zytoskelett sichtbar zu machen. In Leervektor transfizierten Zellen zeigte sich ein deutlich ausgeprägtes Zytoskelett als F-AKTIN-Stressfasern (siehe Abbildung 4.17B). DYRK1A-HA führte zu einer starken Auflösung der Stressfasern, wohingegen mit DYRK1A-K188R-HA transfizierte Zellen einen Phänotypen ähnlich den Kontrollzellen zeigten. Zellen, die mit EGFP-

DYRK1A beziehungsweise dem EGFP-Leervektor transfiziert wurden, zeigten vergleichbare Resultate (siehe Abbildung 6.7B).

Sowohl bei der Fraktionierung von G- und F-AKTIN sowie bei der fluoreszenzmikroskopischen Analyse des F-AKTIN-Zytoskeletts durch Phalloidin zeigte sich, dass DYRK1A einen negativen Einfluss auf die Stabilität von F-AKTIN hat. Für diesen Effekt ist die Kinasefunktion von DYRK1A von Nöten. Die beschriebene Phosphorylierung von ABLIM1 durch DYRK1A könnte hier eine wichtige Rolle spielen.

4.11 ABLIM1 und ABLIM2 stabilisieren das AKTIN-Zytoskelett

Zunächst wurde der Effekt von ABLIM1 (und ABLIM2) auf das AKTIN-Zytoskelett überprüft. Dazu wurden NIH3T3-Zellen stabil mit Flag-getaggttem ABLIM1, ABLIM2 oder einem Leervektor transfiziert (siehe 3.2.1.4.2). Aus diesen Zellen wurde analog zu Abbildung 4.17A G- und F-AKTIN fraktioniert. NIH3T3[ABLIM1-flag] zeigten mit einer relativen G-AKTIN-Menge von 1,3 und einer F-AKTIN-Menge von 0,96 ein Verhältnis von 0,74 F-AKTIN zu G-AKTIN (siehe Abbildung 4.18A). Die Kontrollzellen zeigten mit einem Verhältnis von 0,4 einen deutlich geringeren Anteil an F-AKTIN am gesamten AKTIN der Zelle. 10nM Jasplakinolid führte in beiden Zelllinien zu einer Anreicherung von F-AKTIN. In NIH3T3[ABLIM1-Flag] erhöhte sich das Verhältnis auf 0,86 und in NIH3T3[Leervektor] auf 0,62. Auch unter diesen Umständen zeigte sich ein höheres F-AKTIN zu G-AKTIN Verhältnis in Zellen mit überexprimiertem ABLIM1. Der Blot und die Quantifizierung des Blots zeigen stellvertretend eines von zwei unabhängigen Experimenten. Analog dazu weisen NIH3T3[ABLIM2-Flag] ein relatives Verhältnis von F-AKTIN zu G-AKTIN von 0,25 und NIH3T3[Leervektor] in diesem Experiment von 0,046 auf (siehe Abbildung 4.18B). 10nM Jasplakinolid führten auch hier zu einer Anreicherung der relativen Menge an F-AKTIN. Für NIH3T3[Leervektor]-Zellen auf 0,22 und für NIH3T3[ABLIM2-Flag] auf 0,77. Auch hier ist ein Experiment stellvertretend für zwei gezeigt. Sowohl Zellen mit überexprimiertem ABLIM1 als auch ABLIM2 zeigen stets einen höheren Anteil an F-AKTIN an der Gesamtmenge an AKTIN. ABLIM1/2 führen also zu einer Stabilisierung des AKTIN-Zytoskeletts.

Durch die Verschiebung des AKTIN-Gleichgewichtes zu F-AKTIN, sollte der G-AKTIN-Pool in der Zelle verringert werden und damit die Aktivität von MKL1 steigen (Barrientos et al., 2007; Mouilleron et al., 2011). Um dies zu überprüfen, wurde ein Luziferaseexperiment in HEK293T-Zellen durchgeführt. Als Reporter wurde SRE-Luc verwendet, ein Konstrukt, dass ein „Serum response element“ vor dem ORF der Luziferase aus *Photinus pyralis* beinhaltet. Aktives MKL1 sollte im Kern mit SRF interagieren und zur Transkription der Luziferase führen. Ein ähnliches Experiment wurde bereits für ABLIM2 und ABLIM3 durchgeführt (Barrientos et al., 2007). Da bereits gezeigt wurde, dass DYRK1A mit ABLIM1 interagiert, wurde DYRK1A in diesem

Experiment ebenfalls verwendet, um die Wirkung der Kinase auf die AKTIN-bindenden ABLIMs zu überprüfen. DYRK1A alleine verringert die Luziferaseaktivität von SRE-Luc um mehr als die Hälfte auf das 0,44-fache des Ausgangswertes (siehe Abbildung 4.18C). Flag getaggttes MKL1 führt zu einer starken Erhöhung der Luziferaseaktivität auf das 410-fache des Ausgangswertes. ABLIM1 und ABLIM2 alleine führen ebenfalls zu einer Erhöhung der Luziferaseaktivität auf das 3,6- beziehungsweise 3,1-fache des Ausgangswertes. Die Zugabe von DYRK1A führt zu einer vollständigen Aufhebung des Effektes durch ABLIM1. Auch die Stimulation durch ABLIM2 wird fast komplett aufgehoben, so dass lediglich eine Resterrhöhung von 1,3-fach übrigbleibt. DYRK1A scheint einen negativen Einfluss auf die Luziferaseaktivität des SRE-Luc-Konstruktes zu besitzen. Wie bereits in Abbildung 4.17 gezeigt, führt DYRK1A zu einer Destabilisierung des AKTIN-Zytoskeletts und einer Anreicherung von G-AKTIN. Dieses G-AKTIN kann MKL1 binden und damit inhibieren (Mouilleron et al., 2011). ABLIM1 und ABLIM2 führen zu einer Stabilisierung des AKTIN-Zytoskeletts und damit zum gegenteiligen Effekt wie DYRK1A. Da DYRK1A mit ABLIM1 interagiert und dieses *in vitro* phosphorylieren kann, ist es möglich, dass diese Phosphorylierung für die destabilisierende Funktion von DYRK1A verantwortlich ist. In dem Experiment führt DYRK1A zu einer kompletten Aufhebung des Effektes für ABLIM1, was diese Hypothese unterstützt. Allerdings zeigt DYRK1A diesen Effekt auch ohne exogenes ABLIM, was bedeutet, dass DYRK1A entweder das endogene ABLIM inhibieren kann oder dass es eine weitere Möglichkeit für DYRK1A gibt, das Zytoskelett zu destabilisieren. Auch in NIH3T3-Zellen zeigen MKL1, ABLIM1 und ABLIM2 einen Anstieg der Luziferaseaktivität unter Verwendung des SRE-Luc-Reporters (siehe Abbildung 6.8B).

Als weiterer Beleg für die stabilisierende Funktion von ABLIM1 und ABLIM2 auf das AKTIN-Zytoskelett wurden polyklonale stabile Zelllinien von Flag-getaggttem ABLIM1 und 2 und einem Leervektor angefertigt. Zunächst wurden Gesamtzelllysate der Zellen hergestellt und mittels Westernblot auf das Vorhandensein der ABLIM-Proteine überprüft. Zusätzlich wurden die Zellen mit SAG stimuliert, um den HH-Signalweg zu aktivieren, und die GLI1-Level überprüft. Abbildung 4.18D zeigt das sowohl ABLIM1 (Spuren 3 und 4) als auch ABLIM2 (Spuren 5 und 6) exprimiert werden. SAG (Spuren 2, 4 und 6) führt in allen Zellen zu einer Stimulation des HH-Signalwegs. In Kontrollzellen (Spuren 1 und 2) führt SAG zu einer 2,6-fachen Erhöhung der GLI1-Menge. NIH3T3[ABLIM1-Flag] (Spuren 3 und 4) beziehungsweise NIH3T3[ABLIM2-Flag] (Spuren 5 und 6) zeigen mit einer 3,0- beziehungsweise 3,3-fachen Stimulation durch SAG eine größere Steigerung als die Kontrollzellen. Zusätzlich wurden die Zellen für fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen fixiert und mit California Red-Phalloidin gefärbt (siehe Abbildung 4.18E). Die Kontrollzellen zeigen ein ausgeprägtes AKTIN-Zytoskelett mit Stressfasern und scharf

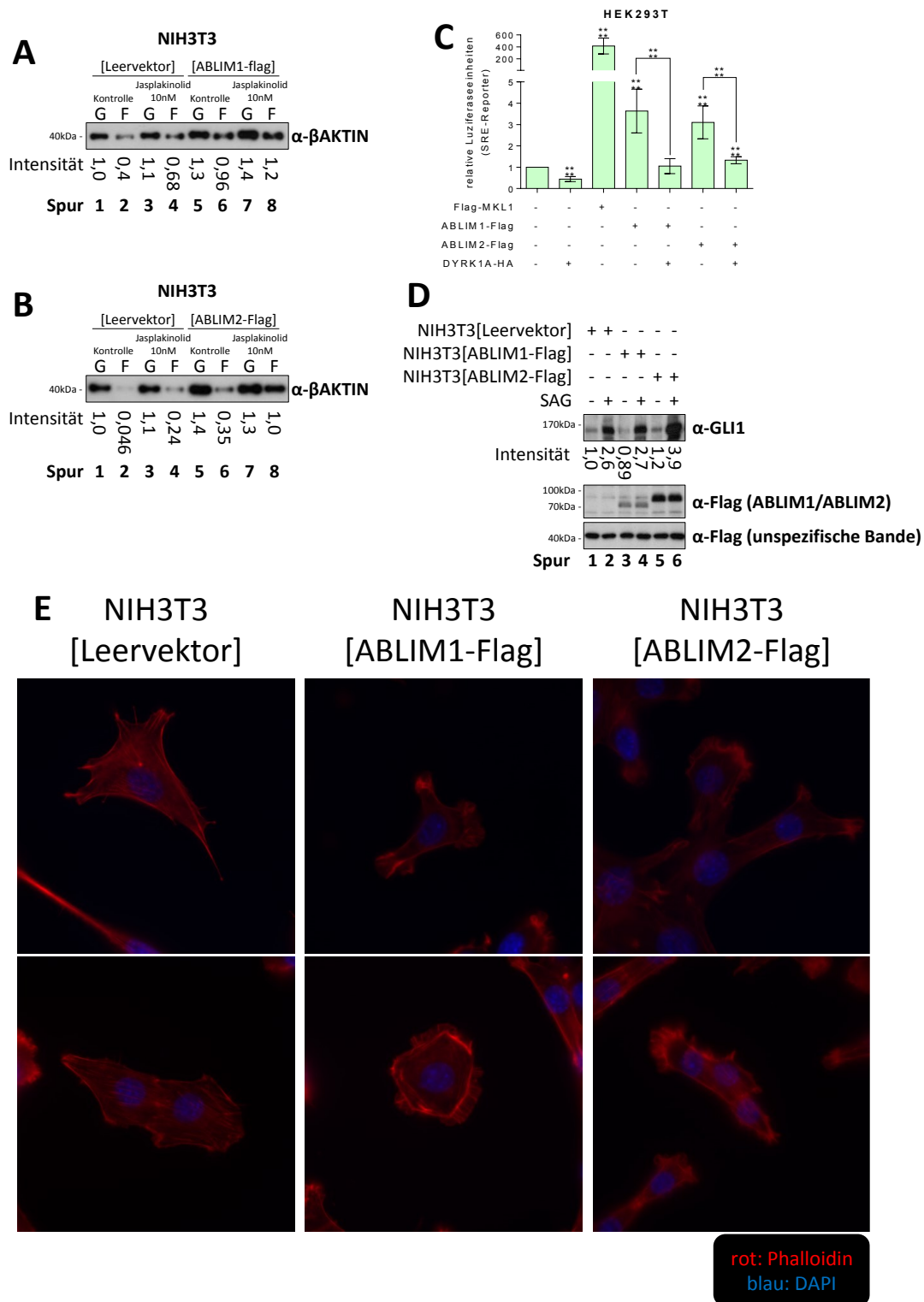


Abbildung 4.18: ABLIM1 und ABLIM2 stabilisieren F-AKTIN. (A) NIH3T3[Leervektor] und NIH3T3[ABLIM1-Flag] wurden für 30 min mit Solvens oder 10 nM Jasplakinolid behandelt. Anschließend wurden F- und G-AKTIN voneinander getrennt und die Fraktionen mittels Westernblot analysiert. Die Banden wurden mittels GELQuantNET quantifiziert. Blot und Quantifizierung sind stellvertretend für zwei unabhängige Experimente. (B) NIH3T3[Leervektor] und NIH3T3[ABLIM2-Flag] wurden für 30 min mit Solvens oder 10 nM Jasplakinolid behandelt. Anschließend wurden F- und G-AKTIN voneinander getrennt und die Fraktionen mittels Westernblot analysiert. Die Banden wurden mittels GELQuantNET quantifiziert. Blot und Quantifizierung sind stellvertretend für zwei unabhängige Experimente. (C) Luciferaseexperiment mit HEK293T-Zellen und dem SRE-Reporter SRE-Luc. Die Zellen wurden mit Kombinationen aus pFlag-MKL1, ABLIM1-Flag, ABLIM2-Flag und DYRK1A-HA transfiziert und die Luciferaseaktivität gemessen. (D) Westernblotanalyse der stabilen Zelllinien NIH3T3[Leervektor], NIH3T3[ABLIM1-Flag], NIH3T3[ABLIM2-Flag] mit und ohne Stimulation durch 100 nM SAG. Die GLI1-Banden wurden mittels

GELQuantNET quantifiziert € California Red-Phalloidininfärbung von NIH3T3[Leervektor], NIH3T3[ABLIM1-Flag], NIH3T3[ABLIM2-Flag]. Phalloidin ist in rot und die Gegenfärbung der Kerne mit DAPI in blau gezeigt. ****: $p < 0,0001$; ***: $p < 0,001$; **: $p < 0,01$; *: $p < 0,05$; signifikanter Unterschied zur Kontrollprobe (Leervektor); t-Test; $n = 7-8$.

abgegrenzten Zellrändern. Zellen, die stabil ABLIM1 exprimieren, zeigen eine starke Präferenz zur Ausbildung von lamellopodienähnlichen Strukturen. Diese Strukturen sind reich an F-AKTIN (Small et al., 1999). Ein weiterer Hinweis dafür, dass ABLIMs zu einer Stabilisierung des AKTIN-Zytoskeletts führt. Zellen, die stabil ABLIM2 exprimieren, zeigen ein ähnliches Verhalten. Eine transiente Transfektion von ABLIM1 und ABLIM2 in NIH3T3-Zellen zeigte ähnliche Resultate (siehe Abbildung 6.8).

Diese Ergebnisse zusammengefasst kann man sagen, dass sowohl ABLIM1 als auch ABLIM2 zu einer Stabilisierung des AKTIN-Zytoskeletts und zu einer Aktivierung von SRE-regulierten Genen führt. DYRK1A führt zu einer Destabilisierung des Zytoskeletts, möglicherweise durch die Phosphorylierung von ABLIM1.

4.12 ABLIM1, ABLIM2 sowie MKL1 wirken stimulierend auf den HH-Signalweg

Um die Hypothese zu untersuchen, dass die Effekte von DYRK1A auf den HH-Signalweg durch ABLIM-Proteine vermittelt werden, wurde zunächst getestet, welchen Effekt ABLIM1 und 2 und MKL1 auf den HH-Signalweg besitzen. Dazu wurde ein Luziferaseexperiment in NIH3T3-Zellen durchgeführt und als Reporter der 8xGliLuc-Reporter beziehungsweise der 8xmut.Gli-Reporter verwendet. Als Abgleich wurde pSV-R verwendet. Die Zellen wurden zusätzlich mit pFlag-MKL1, ABLIM1-Flag, ABLIM2-Flag beziehungsweise einem Leervektor transfiziert und je mit SAG oder dem Lösungsmittel behandelt. In den Kontrollzellen führte SAG zu einer 2,7-fachen Stimulation der relativen Luziferaseaktivität (siehe Abbildung 4.19A). pFlag-MKL1 führt bereits ohne SAG zu einer 2,1-fachen Stimulation die durch SAG nicht weiter erhöht werden konnte. ABLIM1-Flag reduziert die Luziferaseaktivität zunächst auf das 0,69-fache des Ausgangswertes. SAG erhöhte die Luziferaseaktivität auf das 3,6-fache und damit signifikant höher als zusammen mit dem Leervektor. Die Stimulation, bei Transfektion von ABLIM1-Flag durch SAG im Vergleich zu unstimulierten Zellen mit ABLIM1-Flag liegt mit 5,2-fach signifikant höher als in den Kontrollzellen. ABLIM2-Flag führt ebenfalls zunächst zu einer Reduktion der relativen Luziferaseaktivität auf das 0,51-fache. Die Stimulation mit SAG brachte eine mit dem Leervektor vergleichbare Erhöhung auf das 2,6-fache des Ausgangswertes. Die Stimulation für Zellen, die mit ABLIM2-transfiziert wurden, liegt damit bei 5,2. Allerdings ist dieser Unterschied nicht signifikant höher als in den Kontrollzellen.

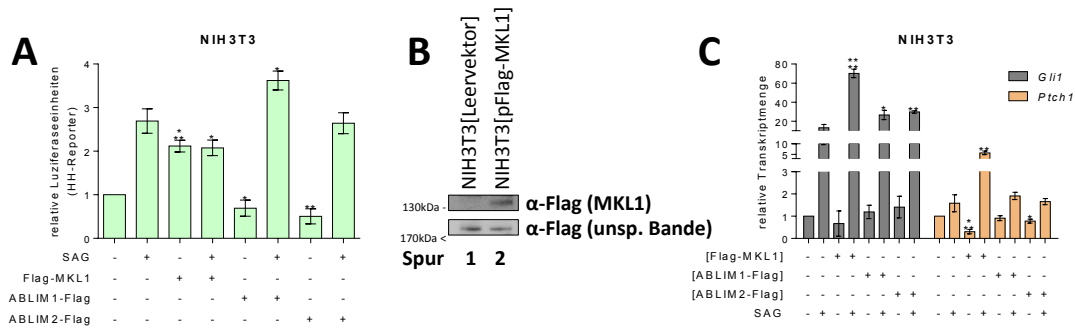


Abbildung 4.19: ABLIMs wirken positiv auf den HH-Signalweg. (A) Luciferaseexperiment in NIH3T3-Zellen mit dem HH-Reporter 8xGliLuc. Die Zellen wurden mit pFlag-MKL1, ABLIM1-Flag, ABLIM2-Flag oder einem Leervektor transfiziert und für 24 h mit dem Solvens oder 100 nM SAG stimuliert. (B) Westernblotanalyse der stabilen Zelllinien NIH3T3[Leervektor], NIH3T3[pFlag-MKL1]. (C) Analyse der relativen mRNA-Mengen von *Gli1* und *Ptch1* der Zelllinien NIH3T3[Leervektor], NIH3T3[pFlag-MKL1], NIH3T3[ABLIM1-Flag] und NIH3T3[ABLIM2-Flag] mit und ohne Stimulation durch 100 nM SAG. ****: $p < 0,0001$; ***: $p < 0,001$; **: $p < 0,01$; *: $p < 0,05$; signifikanter Unterschied zur Kontrollprobe (Leervektor mit jeweiliger SAG-Behandlung); t-Test; (A, D, E, F) $n = 3$.

MKL1 hat einen positiven Einfluss auf den HH-Signalweg. Die Stimulation mit SAG führt zu keiner Erhöhung der Luciferaseaktivität, da das transfizierte MKL1 möglicherweise direkt an die Bindestellen des Luciferasereporters bindet und damit keine weitere Stimulation mehr zulässt. ABLIM1 führt zu einer deutlichen Steigerung der Induktion durch SAG und scheint sich ebenfalls positiv auf den HH-Signalweg auszuwirken. Die leichte Reduktion der Luciferaseaktivität im unstimulierten Zustand ist in diesem biologischen System zu vernachlässigen, da der Signalweg in diesen Zellen fast komplett inaktiviert ist. ABLIM2 zeigt eine ähnliche Tendenz wie ABLIM1, allerdings sind die Effekte nicht so deutlich ausgeprägt.

Parallel zu den in Abbildung 4.18 beschriebenen stabilen Zellen mit ABLIM1-Flag und ABLIM2-Flag wurden auch Zellen stabil mit pFlag-MKL1 transfiziert. Abbildung 4.19B zeigt die Expression des Flag getaggtten MKL1 (Spur 2). Analog zu dem Experiment in Abbildung 4.19A wurde in diesen Zellen die relative Transkriptmenge an *Gli1* und *Ptch1* untersucht, da diese Herangehensweise sensibler ist, als ein Luciferaseexperiment. Dazu wurden die Zellen jeweils mit SAG oder dem Solvens stimuliert und anschließend die mRNA isoliert und mittels quantitativer RT-PCR analysiert. Wie Abbildung 4.19C zeigt führt SAG in den Kontrollzellen zu einer 13-fachen Erhöhung der Menge an *Gli1*-Transkript und zu einer minimalen allerdings nicht signifikanten Erhöhung der *Ptch1*-mRNA. Die stabile Expression von MKL1 hat keinen signifikanten Einfluss auf die Mengen an *Gli1*-mRNA, führt allerdings zu einer Reduktion der *Ptch1*-mRNA auf 0,31. Die Stimulation mit SAG führt zu einer Erhöhung der mRNA Menge von *Gli1* auf das 70-fache im Vergleich zu unstimulierten Kontrollzellen und damit deutlich höher als in den Kontrollzellen. Auch *Ptch1* wird in diesen Zellen stärker exprimiert (5,7-fach im Vergleich zu unstimulierten Kontrollzellen), trotz der Repression in unstimulierten Zellen. Stabil mit ABLIM1-Flag transfizierte NIH3T3-Zellen weisen weder für *Gli1* noch für *Ptch1* eine Veränderung im mRNA-Level auf. Nach Stimulation mit SAG zeigte sich eine signifikant höhere Menge an *Gli1*-

(27-fach), aber nicht an *Ptch1*-Transkript als in den mit SAG stimulierten Kontrollzellen. Die stabil mit ABLIM2-Flag transfizierten Zellen zeigten ohne Stimulation mit SAG keinen Unterschied im *Gli1*-Level, allerdings eine leichte Reduktion für *Ptch1*-mRNA (0,78-fach). Nach Stimulation mit SAG zeigte sich für diese Zellen eine ähnlich starke Stimulation der *Gli1*-Transkription auf das 30-fache des Ausgangswertes. *Ptch1* zeigte keinen signifikanten Unterschied zu den Kontrollzellen und den ABLIM1-Flag-exprimierenden Zellen.

Sowohl MKL1 als auch ABLIM1 und 2 wirken positiv auf den HH-Signalweg. Alle drei Proteine führen nach Stimulation des Signalwegs mit SAG zu einer höheren Transkription von *Gli1*. MKL1 führt außerdem nach Stimulation auch zu einer höheren Transkription von *Ptch1*.

4.13 Die mit MKL1 assoziierte Demethylase KDM3A wirkt ebenfalls positiv auf den HH-Signalweg

Um zu überprüfen, ob eine Depletion von MKL1, ABLIM1 und ABLIM2 die erlangten Ergebnisse bestätigt, wurden MEF-Zellen, die stabil den Liganden SHH exprimieren, mit den entsprechenden siRNA transfiziert, auf 1 % FBS gesetzt, um die Bildung von Primärzilien zu unterstützen, und die mRNA-Level mittels quantitativer qPCR ermittelt. Eine Depletion von *Ablim1* führte zu einer Reduktion der Expression der HH-Zielgene *Gli1* (0,51), *Ptch1* (0,67) und *Ptch2* (0,40) (siehe Abbildung 4.20A). Auch das SRF-Zielgen *Acta2* zeigte eine deutliche Reduktion auf das 0,54-fache des Ausgangswertes. Ein „Knockdown“ von *Ablim2* zeigte für *Gli1* keinen signifikanten Effekt, die Ct-Werte für *Ablim2* lagen in Bereichen, bei denen davon ausgegangen werden muss, dass dieses Protein schwach bis gar nicht exprimiert ist. *Ptch1* und *Ptch2* zeigten nach „Knockdown“ von *Ablim2* einen leichten Anstieg auf jeweils das 1,4-fache des Ausgangswertes. *Mkl1* führte ähnlich wie *Ablim1* zu einer Reduktion der HH-Zielgene. *Gli1* fiel auf 0,40, *Ptch1* auf 0,45 und *Ptch2* auf 0,21. *Acta2* zeigte überraschenderweise einen nur geringen, aber signifikanten Effekt und fiel auf 0,87. *Mkl2* führte für keines der HH-Gene oder für *Acta2* zu einer signifikanten Änderung im Vergleich zur Kontroll-siRNA. Der Knockdown der jeweiligen Transkripte wurde ebenfalls mittels quantitativer qPCR bestätigt (Abbildung 4.20B).

Endogenes *Ablim1* und *Mkl1* wirken aufgrund der bisher erlangten Ergebnisse als deutlicher Aktivator des HH-Signalwegs. *Ablim2* scheint auch eher stimulierend auf den Signalweg zu wirken. Allerdings konnte dieses Ergebnis nicht auf endogener Ebene gezeigt werden. Der Grund hierfür sind wahrscheinlich die zu geringen Expressionslevel von *Ablim2*. Endogenes *Mkl2* hat in dem hier durchgeführten Experiment keinen Einfluss auf den HH-Signalweg.

Da MKL1 mit dem Transkriptionsfaktor SRF interagiert und so zu einer Aktivierung von SRF-Zielgenen führt, ist es vorstellbar, dass MKL1 ebenfalls mit dem Transkriptionsfaktor GLI1

interagiert und so zu einer Expression von HH-Zielgenen führt. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden Myc-getaggttes MKL1 zusammen mit Flag-getaggttem GLI1 in HEK293T-Zellen kotransfiziert und eine Koimmunpräzipitation durchgeführt. Zusätzlich wurde Myc-getaggttes SUFU ebenfalls mit Flag-getaggttem GLI1 als Positivkontrolle kotransfiziert. Alle Proteine konnten in den jeweiligen Gesamtzellextrakten nachgewiesen werden (siehe Abbildung 4.20C; GLI1-Flag: Spuren 2, 3, 5 und 6; MKL1-GFP-Myc: Spuren 1 und 3; Myc-SUFU: Spuren 4 und 6). Nach der Präzipitation mit einem α -Flag-Antikörper konnte GLI1 in allen Proben, in denen es vorhanden war, präzipitiert werden. MKL1-GFP-Myc konnte weder ohne noch mit GLI1-Flag nach der Immunpräzipitation mittels Westernblot nachgewiesen werden. Myc-SUFU konnte zusammen mit GLI1-Flag kopräzipitiert werden. Für Myc-SUFU alleine zeigte sich kein Signal im Westernblot.

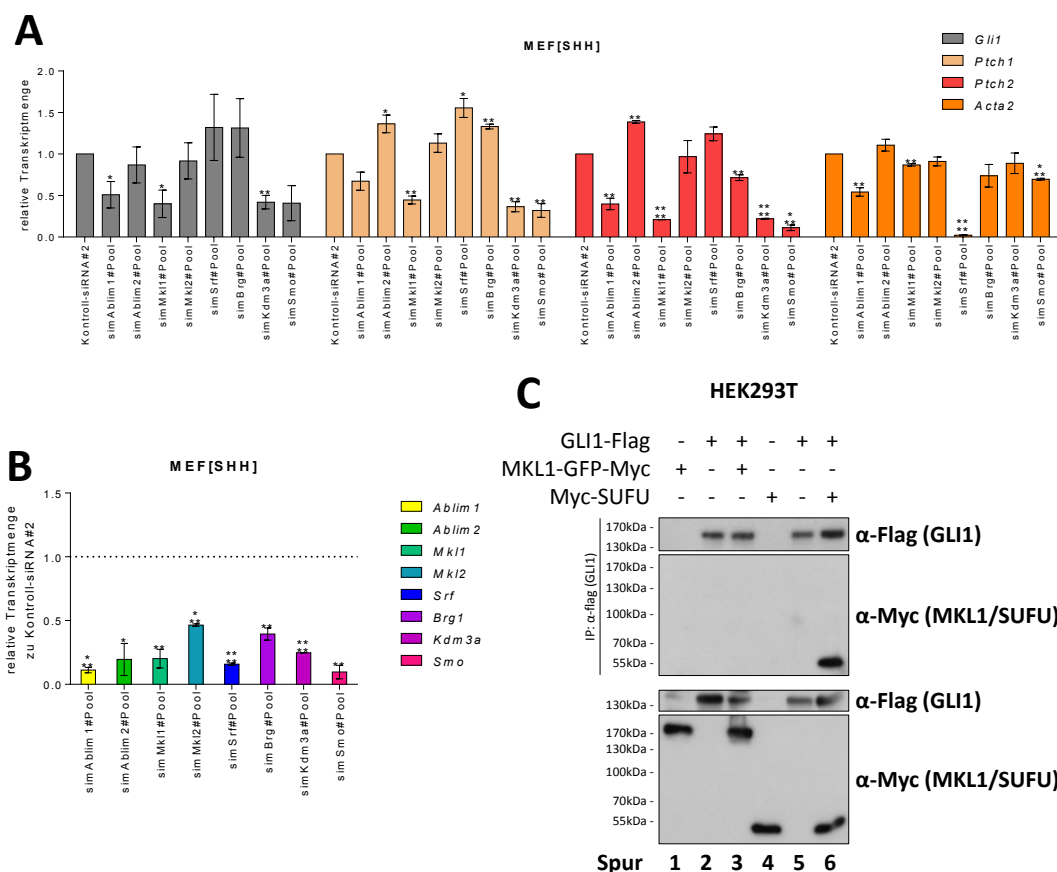


Abbildung 4.20: KDM3A beeinflusst den HH-Signalweg ähnlich wie MKL1 und ABLIM1 und 2. (A) Quantitative RT-PCR von MEF[SHH] nach „Knockdown“ von *Ablim1*, *Ablim2*, *Mkl1*, *Mkl2*, *Srf*, *Brg1*, *Kdm3a* oder *Smo*. Die relativen Transkriptmengen von *Gli1*, *Ptch1*, *Ptch2* und *Acta2* wurden gemessen. (B) Messung der mittels siRNA depletierten mRNA-Level aus (A). (C) Koimmunpräzipitationsexperiment von MKL1-GFP-Myc mit GLI1-Flag oder Myc-SUFU mit GLI1-Flag. ****: $p < 0,0001$; ***: $p < 0,001$; **: $p < 0,01$; *: $p < 0,05$; signifikanter Unterschied zur Kontrollprobe (Kontroll-siRNA#2); t-Test; $n = 2$.

Myc-SUFU interagiert spezifisch mit Flag-GLI1. Diese Interaktion wurde bereits mehrfach gezeigt (Kogerman et al., 1999; Pearse et al., 1999) und daher als Positivkontrolle verwendet. Eine Interaktion von GLI1-Flag mit MKL1-GFP-Myc konnte nicht gezeigt werden und auch andere

Versuche eine solche Interaktion nachzuweisen, wie etwa über eine Koimmunpräzipitation von HA-GLI1 und Flag-getagtem MKL1 (Daten nicht gezeigt) oder die von endogenem GLI1 in SAG stimulierten NIH3T3[pFlag-MKL1] (Daten nicht gezeigt), waren erfolglos. Der Einfluss von MKL1 und damit wohl auch von ABLIM1 muss also unabhängig von einer direkten Interaktion von MKL1 mit GLI1 vonstattengehen.

Interaktionen von MKL1 wurden bereits für andere Proteine beschrieben. Dazu zählen neben SRF, dem am besten charakterisierten Partner von MKL1, auch die Lysin-spezifische Demethylase 3A (KDM3A) (Lockman et al., 2007). ein weiterer Effektor von MKL1 ist BRG1 (Zhang et al., 2007). Abbildung 4.20A zeigt neben den bereits beschriebenen siRNAs auch den Effekt eines „Knockdowns“ der drei Gene dieser Proteine und *Smo*, einer zusätzlichen Positivkontrolle für positive Regulation des HH-Signalwegs. Eine Depletion von *Srf*, dem Gen des wohl bekanntesten Partners von MKL1, führte zu keiner Reduktion der gemessenen HH-Gene, sondern im Gegenteil, eine leichte Induktion der Gene. Allerdings ist diese nur für das Zielgen *Ptch1* statistisch signifikant (1,6-fach). *Acta2* zeigt eine sehr deutliche Reduktion auf das 0,021-fache des Ausgangswertes. Auch ein „Knockdown“ von *Brg1* zeigte keinen signifikanten Effekt für *Gli1*. Allerdings wurde das *Ptch1*-Transkriptlevel signifikant auf 1,3 erhöht wohingegen *Ptch2* signifikant auf das 0,71-fache erniedrigt wurde. *Acta2* wurde nicht signifikant beeinflusst. Die siRNA gegen *Kdm3a* führte zu einer Reduktion aller HH-Zielgene. *Gli1* sank auf 0,42, *Ptch1* auf 0,36 und *Ptch2* auf 0,22. *Acta2* wurde nicht signifikant beeinflusst. Eine Depletion des primären Aktivator des kanonischen HH-Signalwegs *Smo* führte ebenfalls für alle HH-Zielgene zu einer Reduktion (*Gli1*: 0,41; *Ptch1*: 0,32; *Ptch2*: 0,22). *Acta2* wurde signifikant auf 0,70 reduziert. Die effektive Depletion der jeweiligen Gene wird in Abbildung 4.20C gezeigt. In nicht gehungerten Zellen ergibt sich ein ähnliches Bild (siehe Abbildung 6.9).

Die positive Wirkung von ABLIM1 und MKL1 auf den HH-Signalweg wird nicht durch den Transkriptionsfaktor SRF vermittelt und auch BRG1, das bereits zuvor mit dem HH-Signalweg in Verbindung gebracht wurde (Zhan et al., 2011), ist nicht verantwortlich für die MKL1-vermittelten Effekte. *Kdm3a* verhält sich im „Knockdown“ ähnlich wie *Ablim1* und *Mkl1* und wurde zusätzlich als Interaktionspartner von MKL1 beschrieben. Daher ist davon auszugehen, dass diese Demethylase für die Effekte von MKL1 und wohl auch von ABLIM1 auf den HH-Signalweg verantwortlich ist. Die genaue Charakterisierung dieses Effektes bedarf weiterer Untersuchungen.

5 Diskussion

5.1 Überexprimiertes DYRK1A wirkt positiv auf überexprimierte GLI1/2-Transkriptionsfaktoren

In der Literatur sind Effekte von DYRK1A, DYRK1B und DYRK2 auf den HH-Signalweg beschrieben. Ein vergleichendes Experiment zur Überprüfung dieser drei und der anderen beiden Familienmitglieder DYRK3 und DYRK4 zeigte für DYRK1A einen positiven Effekt auf die Aktivität von GLI1 in Abhängigkeit von dessen N-Terminus (siehe Abbildung 4.1), wie es bereits in der Literatur beschrieben ist (Mao et al., 2002; Shimokawa et al., 2008). Der zugrunde liegende Mechanismus wurde mittels nicht-phosphorylierbaren und phosphomimetischen Mutanten noch weiter charakterisiert und eine detailliertere Erklärung der Bedeutung des N-Terminus für die Aktivierung von GLI1 durch DYRK1A wird weiter unten diskutiert (siehe Abschnitt 5.2 und 5.3). GLI2 führt in Kombination mit DYRK1A ebenfalls zu einer erhöhten Aktivität des Signalwegs. Es ist vorstellbar, dass dieser Effekt direkt auf eine Interaktion von GLI2 mit der Kinase DYRK1A zurückzuführen ist. Um diese Hypothese zu bestätigen, müssten allerdings weitere Experimente diesbezüglich gemacht werden, wie etwa fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen bezüglich der GLI2-Lokalisation in Abhängigkeit von DYRK1A. Eine direkte Interaktion dieser beiden Proteine könnte über Koimmunpräzipitations- und Koloalisationsstudien bestätigt oder widerlegt werden. Die Untersuchung der Modellierung der GLI2-Interaktion mit SUFU (Stone et al., 1999) durch DYRK1A, wie es in dieser Arbeit für GLI1 gezeigt wurde, wäre in diesem Zusammenhang ebenfalls interessant. Aufgrund der bisher erlangten Daten ist es auch möglich, dass DYRK1A das „downstream“ von GLI2 angeschaltete GLI1 aktiviert, wie es in dieser Arbeit und der Literatur beschrieben wird (Mao et al., 2002; Shimokawa et al., 2008), und so zu einer Steigerung der HH-Aktivität führt. Um dies zu verhindern, könnte das Luziferaseexperiment in einem *Gli1*^{-/-}-Hintergrund wiederholt werden.

DYRK1B wird eine inhibitorische Funktion im Zusammenhang mit der Aktivierung des HH-Signalwegs durch mutiertes RAS zugeschrieben. Das durch Mutation aktivierte RAS führt zu einer vermehrten Expression des Liganden SHH. Durch noch nicht näher bekannte Prozesse, bei denen DYRK1B eine Rolle spielt, wird die Signalwegskaskade in der sezernierenden Zelle inhibiert, indem sowohl die Funktion von GLI2 als auch die Prozessierung von GLI3 beeinflusst wird. So wird die autokrine Antwort der Zelle verhindert und parakrine Signale bevorzugt (Lauth et al., 2010). DYRK2 wurde ebenfalls als negativer Regulator des Signalwegs beschrieben. DYRK2 phosphoryliert GLI2 und führt so zu einer proteosomalen Degradation des Proteins (Varjosalo et al., 2008). Die Expression von GLI2 wird durch das Zusammenspiel von TGFβ, dem NOTCH-Signalweg und p53 reguliert. Letzteres ist ein Phosphorylierungsziel von DYRK2 und vermittelt

so dessen pro-apoptotische Wirkung. Über p53 erhält DYRK2 eine weitere Möglichkeit zur Regulation von GLI2. Die Aktivierung von SMO – beispielsweise durch die Bindung eines HH-Liganden an PTCH1 – führt zur Stimulation von MAP3K10, welches sowohl SUFU inaktiviert als auch DYRK2 durch Phosphorylierung inhibiert. Als Folge wird GLI2 stabilisiert und im Kern angereichert (Katoh und Katoh, 2008). Die Inhibition des HH-Signalwegs durch DYRK1B und DYRK2 konnten in dieser Arbeit nicht gezeigt werden. Möglicherweise ist die Aktivität der Transkriptionsfaktoren GLI1 und GLI2 durch die Überexpression zu stark, um eine Inhibition sehen zu können. DYRK2 wirkt sogar leicht stimulatorisch auf GLI2, aber nicht auf GLI1 (siehe Abbildung 4.1). DYRK3 und DYRK4 haben bisher keine beschriebenen Funktionen im HH-Signalweg. DYRK3 scheint, zumindest für GLI2, auch eine leicht stimulierende Funktion zu haben und DYRK4 scheint sowohl GLI1 als auch GLI2 inhibieren zu können (siehe Abbildung 4.1). Die Funktionen von DYRK1B, DYRK2, DYRK3 und DYRK4 wurden im Weiteren nicht weiter untersucht. Der Fokus lag auf der Charakterisierung des Effektes von DYRK1A auf den HH-Signalweg.

5.2 Die Serin 102/104- und Serin 130/132-„Cluster“ in GLI1 sind von Bedeutung für dessen Aktivierung durch DYRK1A

2002 wurde gezeigt, dass DYRK1A synergistisch mit SHH wirkt, sowohl auf die Transkription von Zielgenen als auch bei der Differenzierung von C3H10T1/2-Zellen. Auch wurde dort die Stimulation von GLI1 durch DYRK1A beschrieben und es wurde gezeigt, dass die Kinase selbst nicht durch SHH reguliert wird. Daher wurde über einen Mechanismus zur Regulation von GLI1, der unabhängig von SHH ist, spekuliert. DYRK1A phosphorylierte GLI1, verstärkte dessen transkriptionelle Aktivität und führte außerdem zu einer Akkumulation von GLI1 im Zellkern. Die Tatsache, dass DYRK1A auch die transkriptionelle Aktivität einer durch Mutation im Kern gehaltenen Mutante von GLI1 verstärken konnte, war ein Hinweis darauf, dass neben der verstärkten Lokalisation von GLI1 im Kern weitere Regulationsmechanismen durch DYRK1A existieren müssen (Mao et al., 2002). Sowohl die erhöhte transkriptionelle Aktivität als auch die Translokation von GLI1 in den Kern durch DYRK1A wird in dieser Arbeit bestätigt (siehe Abbildung 4.1 und Abbildung 4.2). Die Steigerung der transkriptionellen Aktivität durch DYRK1A wird durch den spezifischen Inhibitor Harmin blockiert (siehe Abbildung 4.5A).

2008 wurde außerdem beschrieben, dass für diese beiden Effekte der N-Terminus von GLI1 eine wichtige Rolle spielt. Die durch Überspringen der Exone 2 und 3 entstehende Isoform GLI1ΔN ließ sich durch DYRK1A weder transkriptionell verstärken, noch in den Kern translozieren. Allerdings war GLI1ΔN auch weniger anfällig für die Zurückhaltung im Cytoplasma durch SUFU als GLI1^{fl}, da die SUFU-Bindedomäne im N-Terminus liegt. In gesunden Zellen wurde GLI1ΔN in

etwa gleichstark wie GLI1 exprimiert, in Tumorzellen war die Expression allerdings geringer. Beide Isoformen wurden durch SHH gleichermaßen stimuliert. GLI1 Δ N besaß eine schwächere transkriptionelle Aktivität als GLI1. Es wurde allerdings darüber spekuliert, ob sie in bestimmten zellulären Kontexten eine stärkere Aktivität als GLI1 besitzt (Shimokawa et al., 2008). Die Beobachtungen, dass für die Steigerung der transkriptionellen Aktivität sowie für die Kerntranslokation von GLI1 durch DYRK1A der N-Terminus des Transkriptionsfaktors benötigt wird, konnten in dieser Arbeit bestätigt werden (siehe Abbildung 4.1 und Abbildung 4.2).

Die Ähnlichkeit des allgemeinen Kerntranslokationssignals SPS (Chuderland et al., 2008) mit der Konsensussequenz für Phosphorylierungen von DYRK1A RPX(S/T)P (Himpel et al., 2000) lässt vermuten, dass DYRK1A eine solche Sequenz phosphoryliert. Die Phosphorylierung eines oder beider Serine in dieser Sequenz führt zu einer Interaktion mit Importin7 und zu einer Translokation des Proteins in

den Zellkern (Chuderland et al., 2008). Im N-Terminus von GLI1 wurden mehrere Sequenzen gefunden, die eine solche Funktion ausüben könnten. Die Serine 102 und 104, sowie 130 und 132 erwiesen sich hier von Bedeutung für die Aktivierung von GLI1 und dessen Translokation in den Zellkern durch DYRK1A. Die

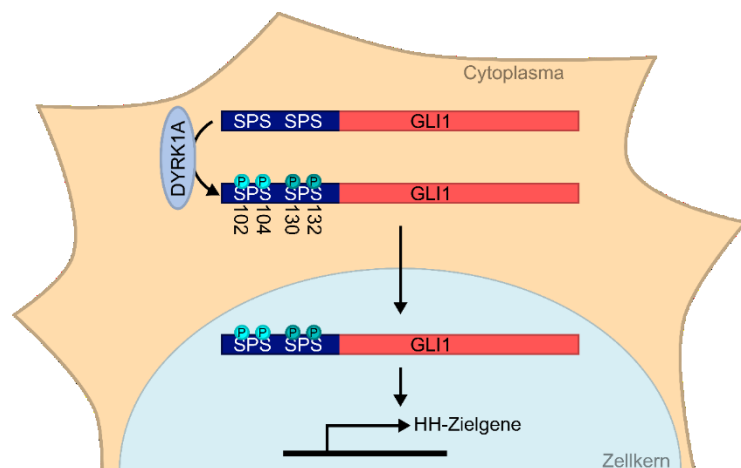


Abbildung 5.1: Serin 102, 104, 130 und 132 in GLI1 sind von Bedeutung für dessen Aktivierung durch DYRK1A.

DYRK1A phosphoryliert mindestens eines der Serine in einem dieser Motive im N-Terminus (blau) von GLI1. Diese Phosphorylierung durch DYRK1A führt zur einer Interaktion von GLI1 mit Importin7 und so zu einer Translokation in den Zellkern und einer verstärkten Expression von GLI1-Zielgenen.

Phosphorylierung eines dieser Motive ist ausreichend, um GLI1 zu aktivieren, da lediglich die Mutante S102/104/130/132A, nicht aber die S102/104A- beziehungsweise S103/132A-Mutanten resistent gegenüber einer Stimulation durch DYRK1A sind (siehe Abbildung 4.2). Ob von den Serinen eines Motives nur eines oder beide durch DYRK1A phosphoryliert werden, bedarf weiterer Untersuchungen, ist aber für die Aktivierung des allgemeinen Kerntranslokationssignals unerheblich. Die positiven Effekte von DYRK1A auf die transkriptionelle Aktivität sowie die Translokation von GLI1 in den Kern lassen sich auf diese beiden Motive beschränken (siehe Abbildung 5.1), da weder die nicht-phosphorylierbare Serin-zu-Alanin- (GLI1-S102/104/130/132A), noch die phosphomimetische Serin-zu-Aspartat-Mutante (GLI1-S102/104/130/132D) in ihrer Lokalisation oder ihrer transkriptionellen Aktivität modifiziert werden können.

5.3 DYRK1A führt zu einer Auflösung des SUFU-GLI1-Komplexes

Das Vorhandensein von SUFU, einem potenten negativen Regulator des HH-Signalwegs (Svard et al., 2006), beeinflusst die Aktivierung von GLI1 durch DYRK1A negativ und DYRK1A beeinflusst die Interaktion von GLI1 mit SUFU (siehe Abbildung 4.3 und Abbildung 4.4). DYRK1A führt in Abhängigkeit seiner Kinasefunktion zu einer Aufhebung der Interaktion von GLI1 mit SUFU. Dieser Effekt tritt allerdings auch auf, wenn die Serine 102, 104, 130 und 132 nicht phosphoryliert werden können (siehe Abbildung 4.4). DYRK1A besitzt also noch weitere Funktionen zur Regulation von GLI1 unabhängig von diesen vier Serinen (siehe Abbildung 5.2). Die Phosphorylierung weiterer Serine oder Threonine innerhalb oder außerhalb des N-Terminus könnte verantwortlich für das Auflösen der Interaktion von GLI1 mit SUFU sein. Die in Abbildung 4.4B beobachtete Ver-

änderung im Laufverhalten der GLI1-S102/104/130/132A-Mutante durch DYRK1A unterstützt diese Hypothese, allerdings haben diese Phosphorylierungen keinen Einfluss auf die transkriptionelle Aktivität oder die subzelluläre Verteilung von GLI1. Denkbar ist auch eine Gerüstfunktion von DYRK1A für die Formierung eines Komplexes mit GLI1 ohne SUFU. Eine ähnliche Funktion wurde für

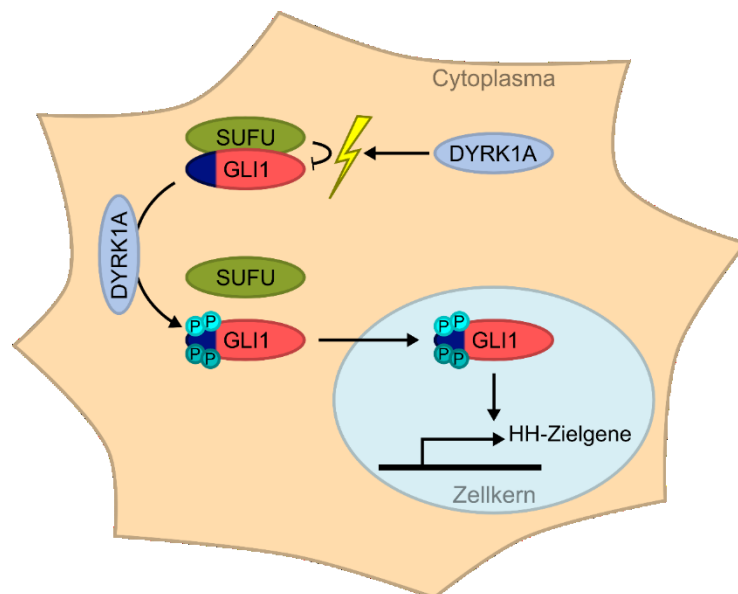


Abbildung 5.2: DYRK1A führt zu einer Auflösung des SUFU-GLI1-Komplexes.

DYRK1A ist in der Lage, die Interaktion zwischen SUFU und GLI1 aufzuheben. Dies geschieht in Abhängigkeit der Kinasefunktion von DYRK1A, jedoch unabhängig von der für die Kerntranslokation/Aktivierung von GLI1 wichtigen Phosphorylierung von Serin 102/104 oder Serin 130/132.

DYRK2 bei der Formierung des EDVP-Komplexes (bestehend aus EDD, DDB1 und VPRBP), einer E3-Ligase, bereits beschrieben. Für diese Gerüstfunktion wird die DYRK2-Kinasefunktion nicht direkt benötigt, wohl aber für die Phosphorylierung und Degradation des Substrates dieser E3-Ligase (Maddika und Chen, 2009). Auch für DYRK1A sind Funktionen beschrieben, die unabhängig von dessen Kinaseaktivität sind, wie etwa bei der synergistischen Wirkung von DYRK1A und ARIP4 bei der Aktivierung der androgen- und glukokortikoidrezeptor-vermittelten Transaktivierung (Sitz et al., 2004). Auch bei der verstärkten nervenwachstumsfaktor (NGF)-vermittelten neuronalen Differenzierung in PC12-Zellen durch die Überexpression von DYRK1A wird die Kinaseaktivität nicht benötigt (Kelly und Rahmani, 2005). Solche Effekte weisen auf

DYRK1A als Gerüstprotein hin. Die Tatsache, dass die Kinasefunktion für die Auflösung des SUFU-GLI1-Komplexes benötigt wird, schließt dies zwar nicht komplett aus, allerdings wäre in diesem Fall die Kinasefunktion vor der Generierung des Komplexes obligatorisch.

Kürzlich wurde eine weitere Variante von GLI1 beschrieben. Bei dieser wird durch RNA-Editierung das Adenosin an Position 2179 zu Inosin und so ein Austausch des Arginins 701 zu Glycin eingeführt. Ein besonders hoher Anteil an so verändertem GLI1 wurde in Zellen des Kleinhirns gefunden. Zelllinien aus Medulloblastomen wiesen im Gegensatz dazu eine reduzierte Editierungsrate auf. Das Wachstum dieser Zellen ließ sich durch Einbringen der GLI1^{R701G}-Variante verringern. Auch in Basalzellkarzinomen wurde GLI1 im Vergleich zu normalen Hautzellen seltener editiert. Diese Variante zeigte eine verstärkte transkriptionelle Aktivität und auch die GLI1-abhängige Zellproliferation wurde beeinflusst. GLI1^{R701G} war außerdem weniger anfällig gegenüber der Inhibition durch SUFU und auch die Verstärkung der transkriptionellen Aktivität durch DYRK1A war weniger ausgeprägt. In Mäusen scheint dieses Editieren nicht stattzufinden, so dass die Forscher davon ausgingen, dass nur in Primaten eine solche posttranskriptionelle Modifikation der *GLI1*-mRNA stattfindet (Shimokawa et al., 2013). Diese Ergebnisse geben weitere Hinweise darauf, dass DYRK1A GLI1 auch außerhalb des N-Terminus beeinflussen kann. Weder bei Arginin noch bei Glycin handelt es sich um phosphorylierbare Aminosäuren, jedoch besitzt auch die DYRK1A Erkennungssequenz RPX(S/T)P zwei Stellen vor der phosphorylierten Aminosäure ein Arginin. Die Aminosäuresequenz um Arginin 701 in GLI1 lautet SITENAAMDARGLQEEPEVG (Aminosäuren 691 bis 710; Arginin 701 unterstrichen). In dieser Sequenz befinden sich C-terminal von Arginin 701 keine phosphorylierbaren Aminosäuren, so dass dieses Arginin wohl nicht Teil einer Erkennungssequenz ist. Aufgrund der beschriebenen Voraussetzungen für eine Phosphorylierung durch DYRK1A (siehe 2.2) ist es unwahrscheinlich, dass dieses Arginin die Phosphorylierung von weiter N-terminal liegenden Aminosäuren beeinflusst. Die Möglichkeit, dass diese Position dennoch als DYRK1A-Bindestelle für eine weiter entfernte Phosphorylierung dient, lässt sich dennoch nicht komplett ausschließen. Eine kinaseunabhängige Funktion von DYRK1A in GLI1, die zur Regulation der GLI1-SUFU-Interaktion beitragen könnte, ist ebenfalls vorstellbar.

Um zu überprüfen, welche Proteinabschnitte für diesen Effekt durch DYRK1A in GLI1 benötigt werden, könnte man ausgehend von der minimalen SUFU-Bindestelle in GLI1 (SPGGSYGHLS an Position 116-125) GLI1-Fragmente herstellen und testen, ob diese mit SUFU interagieren und ob diese Interaktion durch DYRK1A aufgelöst werden kann. Jedoch ist es auch denkbar dass DYRK1A SUFU phosphoryliert und so zu einer Auflösung des Komplexes führt. Eine direkte Interaktion dieser beiden Proteine konnte jedoch nicht gezeigt werden. Eine *in silico* Suche nach möglichen Phosphorylierungsstellen in SUFU durch DYRK1A, sowie die Verifizierung dieser mittels *in vitro*-

Experimenten könnte zunächst die Fähigkeit von DYRK1A, SUFU zu phosphorylieren, überprüfen.

5.4 DYRK1A wirkt abhängig von Zelltyp und Zustand des HH-Signalwegs stimulierend oder inhibierend auf den HH-Signalweg

Die Literatur beschreibt DYRK1A als einen Aktivator des HH-Signalwegs (Mao et al., 2002; Shimokawa et al., 2008) und auch in den obigen Experimenten zeigte sich DYRK1A immer als positiver Regulator des HH-Signalwegs. In den Experimenten dieser Arbeit wurden bisher immer DYRK1A und GLI1 beziehungsweise GLI2 überexprimiert. Unter physiologischen Umständen kann dies nur unter bestimmten zellulären Bedingungen bestätigt werden, denn sowohl eine Inhibition als auch eine Depletion von DYRK1A führen nicht in allen Fällen zu der erwarteten verminderten Stimulation des HH-Signalwegs, sondern jeweils zu zelltypspezifischen Effekten.

Die Spannweite der Wirkung von DYRK1A auf den HH-Signalweg in den Experimenten dieser Arbeit deckt alle erdenklichen Möglichkeiten ab. In einigen Zelllinien scheint endogenes DYRK1A keinen Einfluss auf die HH-Aktivität zu haben. In Shh-LIGHT2, einer Zelllinie, die von NIH3T3 abstammt (Taipale et al., 2000), hat die Inhibition von endogenem DYRK1A mittels Harmin keinen Einfluss auf die Aktivität des HH-Signalwegs nach Stimulation mit dem Aktivator SAG (siehe Abbildung 4.5B). In den Zelllinien SU.86.86 und in HEK293T zeigt der „Knockdown“ von *DYRK1A* wenig bis keinen Effekt auf die Menge an *GLI1*-Transkript und damit auf die HH-Aktivität (siehe Abbildung 4.6). Die signifikante Reduktion von *GLI1* auf 0,87 durch sihDYRK1A#2 in HEK293T-Zellen kommt eventuell durch einen schwachen unspezifischen Effekt dieser siRNA in diesen Zellen zustande und hat wohl keine biologische Relevanz. Auch in MEF-Zellen mit *Sufu*- oder *Ptch1*-„Knockout“ und damit mit einer ektopischen Aktivierung des Signalwegs (Goodrich et al., 1997; Svard et al., 2006; Taipale et al., 2000) wirkt sich eine Depletion von DYRK1A nicht auf die Transkriptmengen von *Gli1* und *Ptch1* und damit auf den HH-Signalweg aus (siehe Abbildung 4.7).

Im Gegensatz dazu führt eine Überexpression von DYRK1A in diesen MEF-Zellen – anders als in solchen mit einem *Smo*-„Knockout“ und damit einem inaktiven Signalweg (siehe Abbildung 4.9C, D) – zu einer deutlichen Inhibition der Transkription der gemessenen Zielgene und damit des Signalwegs (siehe Abbildung 4.9A, B, D). Auch in Shh-LIGHT2-Zellen zeigt sich ohne Stimulation durch SAG ein Anstieg der basalen Hedgehogaktivität mit steigender Harminkonzentration (siehe Abbildung 4.5B). In diesen Zellen könnte dafür jedoch auch die Inhibition von DYRK1B durch Harmin verantwortlich sein. Die Wirkung auf DYRK2, das ebenfalls durch Harmin inhibiert wird, ist wahrscheinlich zu schwach, um hier eine Rolle zu spielen (Bain et al., 2007; Gockler et al., 2009). In der Medulloblastomzelllinie DAOY kann DYRK1A ebenfalls inhibierend wirken, denn

DAOY-Zellen mit einem *DYRK1A*-„Knockdown“ zeigen eine deutliche höhere Signalwegsaktivität nach Stimulation mit SAG als die Kontrollzellen (siehe Abbildung 4.8B). All dies spricht für eine Inhibition des Signalwegs durch *DYRK1A*.

Ohne die Stimulation durch SAG wirkt *DYRK1A* in DAOY-Zellen jedoch als positiver Regulator des Signalwegs, denn hier führt die Depletion von *DYRK1A* zu einer Reduktion des *GLI1*-Transkriptes für eine von zwei siRNA-Sequenzen und des *PTCH1*-Transkriptes für beide (siehe Abbildung 4.8B). In T98G-Zellen, einer Zelllinie, die einem Glioblastom entspringt, verhält es sich in diesem Fall identisch. Hier zeigt sich endogenes *DYRK1A* ebenfalls als Stimulator, denn eine Reduktion von *DYRK1A* mittels siRNA führt auch hier zu einer Reduktion von *GLI1* und *PTCH1* (siehe Abbildung 4.8A). Eine Stimulation mit SAG ist in diesen Zellen nicht möglich.

Die letztendliche Bedeutung von *DYRK1A* für den HH-Signalweg hängt von einer großen Menge an Faktoren im Zellkontext ab. Der HH-Signalweg kann sogar in ein- und derselben Zelllinie von *DYRK1A* aktiviert, aber auch inhibiert werden. Ein ähnlicher Effekt wurde bereits bei dem Protein BRG1 beschrieben. Dieses Protein ist sowohl für die vollständige Aktivierung des Signalwegs, aber auch für die Aufrechterhaltung des inaktiven Zustandes vonnöten (Zhan et al., 2011). Das Gleichgewicht zwischen den verschiedenen an diesen Kaskaden beteiligten Proteinen, insbesondere zwischen den bekannten und bisher unbekannten GLI1-Varianten, könnte die endgültige Auswirkung von *DYRK1A* auf den HH-Signalweg bestimmen. Für GLI1 existieren mindestens fünf verschiedene Isoformen, von denen drei durch alternatives Spleißen entstehen. Eine weitere Isoform entsteht durch posttranslationale N-terminale Trunkierung und auch eine C-terminal deletierte Variante existiert (Ruiz i Altaba, 1999; Stecca und Ruiz i Altaba, 2009). Zusätzlich kann die *GLI1*-mRNA posttranskriptionell editiert werden (Shimokawa et al., 2013). Kürzlich wurde gezeigt, dass die N-terminal trunkierte Isoform als einzige für die gesteigerte Expression von C-JUN durch GLI1 verantwortlich ist (Amable et al., 2014). Durch diese Vielzahl an GLI1-Varianten kann die Zelle eventuell mögliche Regulationsmechanismen durch *DYRK1A* umgehen, denn es wurde gezeigt, dass *DYRK1A* weniger beziehungsweise einen anderen Einfluss auf GLI1 Δ N und GLI1^{R701G} als auf nicht-editiertes GLI1^{fl} hat (Shimokawa et al., 2013; Shimokawa et al., 2008). Welchen Einfluss *DYRK1A* auf weitere bekannte und noch unbekannte Isoformen von GLI1 hat, bedarf weiterer Untersuchungen und das Gleichgewicht der verschiedenen Isoformen könnte die letztendliche Bedeutung von *DYRK1A* für den HH-Signalweg steuern. Mittels SAG, eines Liganden für SMO, wird der HH-Signalweg aktiviert und die Expression von GLI1 entspricht vom Promotor bis hin zum fertigen Protein den zelleigenen Regulationsmechanismen. Durch die Überexpression von GLI1 in den vorherigen Experimenten werden einige dieser Regulationsmechanismen zumindest zum Teil außer Kraft gesetzt, wodurch einige der kontroversen Ergebnisse erklärt werden können. Zusammen mit der

Überexpression von DYRK1A und der damit ebenso fehlenden Regulation dieses Proteins kommt es zur Favorisierung der aktivierenden Funktionen von DYRK1A auf GLI1. Diese sind aber durchaus von biologischer Relevanz, da auch in einigen Fällen stimulierende Funktionen von endogenem DYRK1A auf den HH-Signalweg gezeigt werden konnten.

Eine ektopische Überexpression von DYRK1A ist auch in einigen pathologischen Zuständen vorhanden. Vor allem für die Auswirkungen der Trisomie 21 spielt DYRK1A eine ausschlaggebende Rolle (Hammerle et al., 2003b; Park et al., 2009), was auch einen Hinweis darauf gibt, warum DYRK1A vor allem in Zellen neuronalen Ursprungs eine Bedeutung für den HH-Signalweg hat (siehe Abbildung 4.8). Denn ein Zusammenhang zwischen HH und dem Down-Syndrom wurde bereits gezeigt. Sowohl die Inhibition von DYRK1A, aber auch die Aktivierung des HH-Signalwegs kann einigen der Auswirkungen der Trisomie 21 entgegenwirken (Costa und Scott-McKean, 2013). Diese Verbindung, sowie das vergleichsweise hohe Expressionslevel von DYRK1A in T98G- und DAOY-Zellen (siehe Abbildung 4.8C) könnten eine Erklärung für diese Ergebnisse sein. In zerebellaren Körnerzellen mit einer solchen Trisomie wurde weiterhin eine abgeschwächte Antwort auf SHH beobachtet. Es wird vermutet, dass diese Verminderung der HH-Aktivität für einige der neurologischen Störungen verantwortlich ist (Currier et al., 2012). DYRK1A könnte auch hier als Inhibitor des HH-Signalwegs fungieren. Die Bedeutung von DYRK1A für den HH-Signalweg scheint komplexer zu sein, als zunächst angenommen. Vor allem für die inhibierende Funktion von DYRK1A gab es bisher nur wenige Hinweise. Die Aufklärung des molekularen Mechanismus könnte neue Therapien für die Krebsforschung bringen und auch das Verständnis und die Behandlung des Down-Syndoms voranbringen. Eine weitere Untersuchung des zugrunde liegenden Mechanismus ist daher sehr lohnenswert.

5.5 Der basische Fibroblasten-Wachstumsfaktor inhibiert den HH-Signalweg

2007 wurde für FGF-2 ebenfalls ein inhibitorischer Effekt für den HH-Signalweg beschrieben. Der FGF-Signalweg reguliert, wie auch SHH, das Wachstum und die Differenzierung im Nervensystem. In Vorläufern von Körnerzellen („Granule cell precursors“ = GCPs) konnte FGF-2 sowohl die SHH-getriebene Proliferation als auch die Expression von HH-Zielgenen inhibieren. Diese Inhibition findet wahrscheinlich oberhalb der GLI-vermittelten Transkription statt. Auch hier hängt die Auswirkung von FGF-2 vom zellulären Kontext ab. So kann FGF-2 in GCPs die Differenzierung fördern, wohingegen in Zellen mit einer Mutation in *Ptch1* die Differenzierung blockiert wird (Fogarty et al., 2007). Die Entwicklung von Medulloblastomen aus GCPs durch aberrante Aktivität von SHH und der dadurch induzierten Proliferation kann durch den Einsatz von FGF-2 vermindert werden (Emmenegger et al., 2013). Einige Berichte beschreiben jedoch eher synergistische Interaktionen zwischen dem FGF- und dem HH-Signalweg (Kessaris et al.,

2004; Ye et al., 1998), wie etwa die Induktion von GLI2 (Brewster et al., 2000). Es wurde eine Aktivierung von GLI1 durch FGF-2 gezeigt, die durch ERK vermittelt wurde und den N-Terminus von GLI1 benötigte (Riobo et al., 2006a), ähnlich wie es für DYRK1A beobachtet wurde. Eine Stimulation von Zellen mit FGF-2 führt außerdem zu einer Phosphorylierung von DYRK1A (Kottakis et al., 2011). Diese beiden Ergebnisse zusammengekommen machen den Wachstumsfaktor zu einem lohnenden Untersuchungsobjekt bezüglich der beobachteten Effekte von DYRK1A auf die HH-Aktivität.

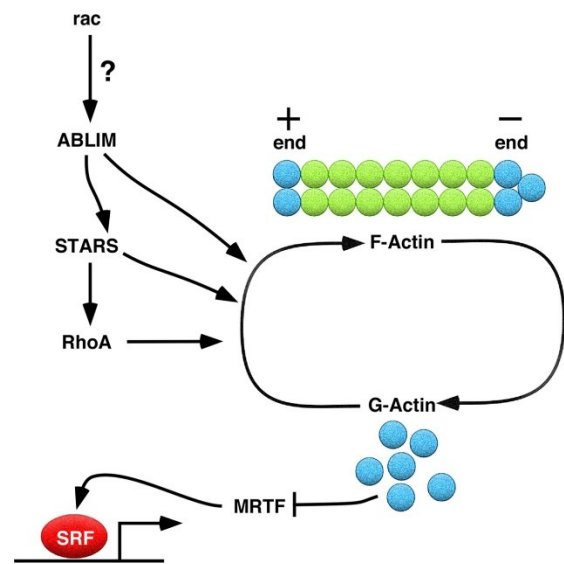
Das in dieser Arbeit verwendete Luziferasesystem zeigte sich anfällig für unspezifische Stimulation durch FGF-2, was diese Ergebnisse in Frage stellt (siehe Abbildung 4.10 und Abbildung 4.11). Dennoch war in NIH3T3 mit inaktivem HH-Signalweg eine leichte Induktion von *GLI1* auf mRNA-Ebene zu beobachten (siehe Abbildung 4.12A). FGF-2 kann also als Stimulator des HH-Signalwegs wirken. Andere Experimente zeigten vor allem bei bereits aktivem HH-Signalweg für FGF-2 einen stark inhibitorischen Effekt. So konnte beispielsweise die SAG-vermittelte Stimulation des HH-Signalwegs in Shh-LIGHT2-Zellen durch FGF-2 annähernd vollständig inhibiert werden (siehe Abbildung 4.13) und auch in *Sufu*- und *Ptch1*-„Knockout“-MEFs ließ sich mit FGF-2 eine starke Verminderung der gemessenen HH-Zielgene zeigen (siehe Abbildung 4.14). FGF-2 wirkt demnach stimulierend auf die basale HH-Aktivität und als Inhibitor bei bereits aktiviertem Signalweg. Eine mögliche Hemmung des Signalwegs aufgrund der proliferativen Funktion von FGF-2 und der mit der Zellproliferation verbundenen Auflösung des Primärziliums kann weitestgehend ausgeschlossen werden. FGF-2 führt zwar in der Tat zur Verminderung der Ziliendichte einer Zellpopulation (siehe Abbildung 6.5), jedoch zeigt sich die Inhibition auch deutlich in *Sufu*-„Knockout“-Zellen, bei denen das Zilium keine Bedeutung für die Signalwegsaktivität besitzt (Chen et al., 2009; Svard et al., 2006).

Diese Effekte ließen sich mit dem DYRK1A-Inhibitor Harmin zwar beeinflussen, aber nur minimal (siehe Abbildung 4.15). DYRK1A könnte hierbei zwar eine Rolle spielen, jedoch scheint die Kinase keine starke Bedeutung bei den FGF-2-vermittelten Effekten auf den HH-Signalweg zu besitzen. Um die DYRK1A vermittelte Inhibition des HH-Signalwegs weiter zu untersuchen, wurde daher nach möglichen Zielen für eine Phosphorylierung durch DYRK1A gesucht. Dabei wurde das AKTIN-bindende LIM Protein 1 (ABLIM1) gefunden.

5.6 Regulation des HH-Signalwegs über AKTIN-bindende LIM-Proteine

Eine weitere Funktion von DYRK1A ist die Destabilisierung des AKTIN-Zytoskeletts (Dowjat et al., 2012; Liu et al., 2009; Martinez de Lagran et al., 2012; Park et al., 2012). In dieser Arbeit konnte die Depolymerisation von F-AKTIN anhand fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen sowie mittels einer Fraktionierung von G- und F-AKTIN gezeigt werden (siehe Abbildung 4.17) und damit die negative Wirkung von DYRK1A auf das AKTIN-Zytoskelett bestätigt werden. Es ist bekannt, dass mDia1, ein Regulator des AKTIN-Zytoskeletts, im Zusammenspiel mit HAN11 („Human homologue of anthocyanin 11“) die DYRK1A vermittelte Steigerung der transkriptionellen GLI1-Aktivität blockiert. Die direkte Interaktion von DYRK1A sowohl mit mDia1 als auch mit HAN11 (Morita et al., 2006), könnte für eine Inhibition der Kinase durch diese Proteine sprechen. Ein zweiter Weg der Regulation des HH-Signalwegs durch DYRK1A ist ebenfalls vorstellbar. Diese Arbeit gibt erste Hinweise darauf, dass ein solcher Weg existiert und dass dieser unabhängig von der direkten GLI1-Aktivierung durch DYRK1A ist, sondern indirekt über das AKTIN-Zytoskelett wirkt. In einem *in vitro* Kinase „Screen“ zeigte sich ABLIM1 als Phosphorylierungsziel für DYRK1A (siehe Abbildung 4.16A, P. Holz). Im menschlichen Genom liegt ABLIM1 auf Chromosom 10q25, einer Region, die in Krebszellen oft deletiert ist (Kim et al., 1997). Auch wurde in

Nebennierenrindenkarzinomen eine verringerte Menge an ABLIM1 im Vergleich zu gutartigen Nebennierenrindenadenomen gefunden (Soon et al., 2009). Diesem Protein wird eine zentrale Rolle in diversen Funktionen der Zelle nachgesagt, indem es LIM-Proteine mit dem AKTIN-Zytoskelett koppelt (Roof et al., 1997). Unter anderem wird ABLIM1 mit der Etablierung der Links-Rechts-Asymmetrie in Verbindung gebracht (Stevens et al., 2010), ein Prozess, der durch den HH-Signalweg reguliert wird (Levin et al., 1995). ABLIM1 und ABLIM3 beeinflussen außerdem die Ziliogenese (Cao et al., 2012), ein weiterer Aspekt, der von großer Bedeutung für den HH-Signalweg ist (Oro, 2007). Wie der Name AKTIN-bindendes LIM Protein bereits sagt, binden diese Proteine



(Barrientos et al., 2007)

Abbildung 5.3: Angenommenes Modell der Aktivierung von SRF über die ABLIM-Proteine 2 und 3 in gestreiften Muskelzellen.

ABLIM-Proteine interagieren mit STARS („Striated muscle activator of Rho signaling“) und beeinflussen die STARS-abhängige Aktivierung der transkriptionellen Aktivität von SRF („Serum response factor“) positiv (Barrientos et al., 2007). Sowohl ABLIM-Proteine als auch STARS und RhoA führen zu einer Polymerisation von F-AKTIN und damit zu einer Depletion des G-AKTIN-Pools. Dies wiederum führt zu einer Verminderung der MRTF (=MKL)-Inhibition durch freies G-AKTIN und letztendlich zur Expression von SRF-regulierten Zielgenen

an F-AKTIN (Klimov et al., 2005; Krupp et al., 2006; Matsuda et al., 2010; Roof et al., 1997) und die positive Wirkung dieser Proteine auf die Ausbildung von Filo- und Lamellipodien, sowie ihre Bedeutung für die Zellmigration unter anderem durch die Ausbildung von Wachstumskegeln wurde bereits beschrieben (Demarco und Lundquist, 2010; Norris et al., 2009; Shakir et al., 2008; Yang und Lundquist, 2005). Diese Arbeit gibt weitere Hinweise für die Stabilisierung des AKTIN-Zytoskeletts durch ABLIM1 und ABLIM2 (siehe Abbildung 4.18A, B, D, E). Eine Steuerung der Genexpression durch diese Proteine wurde 2007 gezeigt. So wirkten ABLIM2 und ABLIM3 in gestreiften Muskelzellen synergistisch mit STARS auf die Aktivierung von SRF (siehe Abbildung 5.3) (Barrientos et al., 2007).

Unter Verwendung eines anderen Reporter- und Zellsystems, zeigte sich in dieser Arbeit, dass sowohl ABLIM1 als auch ABLIM2 zu einer erhöhten Aktivität des SRF Signalwegs führen. DYRK1A zeigte sich als negativer Mediator der SRF-getriebenen Transkription (siehe Abbildung 4.18C). Die gegenseitige Wirkung von DYRK1A und ABLIM1 sowie ABLIM2 sowohl auf die transkriptionelle Aktivität von SRF und auf das AKTIN-Zytoskelett, lässt sich eventuell über die beobachtete Interaktion und Phosphorylierung von ABLIM1 durch DYRK1A zurückführen (siehe Abbildung 4.16). Dies führt zu der Hypothese, dass DYRK1A ABLIM1 (und eventuell ABLIM2) phosphoryliert und diese so vom AKTIN-Zytoskelett ablöst. Die stabilisierende Wirkung der ABLIM-Proteine fällt weg, was zum Teil zu der durch DYRK1A-vermittelten Destabilisierung des AKTIN-Zytoskeletts und damit zur Regulation von MKL1 beiträgt. Auch MKL1 selbst, als beschriebener Koaktivator von SRF (Cen et al., 2003; Miralles et al., 2003; Selvaraj und Prywes, 2003; Wang et al., 2002), aktiviert, wie zu erwarten, diesen Signalweg (siehe Abbildung 4.18C). Bezüglich des HH-Signalwegs zeigt diese Arbeit, dass ABLIM1 – und ABLIM2, wenn auch weniger ausgeprägt – die Empfänglichkeit der Zellen für SAG und damit den HH-Signalweg positiv beeinflussen. Auch MKL1 steigerte die Empfänglichkeit für SAG bei stabiler Expression. Im Luziferaseexperiment zeigte sich dieser Effekt nicht (siehe Abbildung 4.19), was möglicherweise an einer Sättigung des Reporters mit Komplexen aus MKL1 und einem Transkriptionsfaktor liegt. In Zellen mit stabiler Expression des Liganden SHH führt sowohl ein „Knockdown“ von *Ablim1* als auch *Mkl1* zu einer Verminderung der HH-Zielgentranskription, was die Annahme dieser Proteine als positive Regulatoren des HH-Signalwegs bestärkt. Ein „Knockdown“ von *Ablim2* zeigte wahrscheinlich aufgrund seiner generell niedrigen Transkriptionsrate keinen Effekt auf HH-Zielgene. *Mkl2* zeigt ebenfalls keinen Effekt (siehe Abbildung 4.20A). MKL1 und MKL2 sind zwar eng verwandt, haben aber sehr verschiedene Funktionen (Parmacek, 2007).

Zusammenfassend führt dies zu der Annahme, dass DYRK1A ABLIM1 und eventuell ABLIM2 phosphoryliert und so zu einer Aufhebung der AKTIN-stabilisierenden Funktion des Proteins

führt. Dieses wiederum führt zu einer Inaktivierung von MKL1 durch mehr freies G-AKTIN. Diese Kaskade könnte den negativen Einfluss von DYRK1A auf den HH-Signalweg erklären.

5.7 Positiver Effekt von MKL1 auf den HH-Signalweg mittels DNA-Remodellierung?

Die am besten charakterisierte Funktion von MKL1 ist die als Koaktivator von SRF. Zusammen führen diese beiden zur Expression von SRE-regulierten Genen (Cen et al., 2003; Miralles et al., 2003; Selvaraj und Prywes, 2003; Wang et al., 2002). Ein „Knockdown“ dieses Faktors führt allerdings nicht zu einer Verminderung der HH-Zielgene (siehe Abbildung 4.20A). Daher müssen andere Faktoren zusammen mit MKL1 als Stimulator für den HH-Signalweg dienen.

BRG1 – ein Teil des ATP-abhängigen Chromatin-Remodellierungskomplexes SWI/SNF – interagiert mit dem N-Terminus von MKL1. Dominant-negatives BRG1 führte zu einer Blockade der MKL1-gesteuerten Transkription von Genen, die spezifisch für Zellen der glatten Muskulatur sind, nicht aber von AKTIN/RHO-abhängige frühe Antwortgene (Zhang et al., 2007). Wie bereits zuvor erwähnt, ist dieses Protein sowohl für die vollständige Aktivierung des HH-Signalwegs, als auch für die Aufrechterhaltung seines inaktiven Zustandes vonnöten (Zhan et al., 2011). Auch eine Depletion von *Brg1* hatte keinen Einfluss auf die gemessenen HH-Zielgene (siehe Abbildung 4.20A).

Die Histondemethylase KDM3A interagiert ebenfalls mit MKL1 über dessen N-Terminus. Diese Interaktion wurde funktionell über ein Hefe-Zwei-Hybrid-System ermittelt und mittels eines GST-„Pulldowns“ bestätigt. Die Interaktion wurde in der jumonjiC-Domäne in KDM3A lokalisiert. KDM3A demethyliert Histon 3 an Lysin 9 (H3K9), ein Marker für transkriptionell inaktives Heterochromatin (Lockman et al., 2007). Ein „Knockdown“ von *Kdm3a* führte ebenso wie bei *Ablim1* und *Mkl1* zu einer Verminderung der HH-Zielgenexpression (siehe Abbildung 4.20A). Die positive Wirkung von ABLIM1 und MKL1 auf den HH-Signalweg könnte daher über KDM3A vermittelt werden. Eine Demethylierung von H3K9 und die damit verbundene Ausbildung von Euchromatin in den für den HH-Signalweg wichtigen Chromatinregionen könnte die Transkription dieser Gene ermöglichen beziehungsweise verstärken. Der Inhibition des HH-Signalwegs durch DYRK1A könnte also letztendlich das Ausbleiben der Histondemethylierung durch KDM3A zugrunde liegen. Der Beweis einer solchen Histonmodifikation im Bereich von HH-Zielgenen könnte mittels Chromatin-Immunpräzipitationsexperimenten erbracht werden. In Abbildung 5.4 ist das angenommene Modell der Wirkung von DYRK1A auf den HH-Signalweg zusammengefasst. Ob in der Zelle letztendlich der aktivierende oder inhibierende Arm der stärkere ist, hängt von vielen Faktoren ab. Dazu gehört zunächst der Einfluss jedes einzelnen

beteiligten Proteins für die Zelle. Aber auch das Gleichgewicht der beschriebenen GLI1-Varianten hat Auswirkungen auf die letztendliche Funktion der Kinase in dem jeweiligen Zelltyp.

stimulatorisch

inhibitorisch

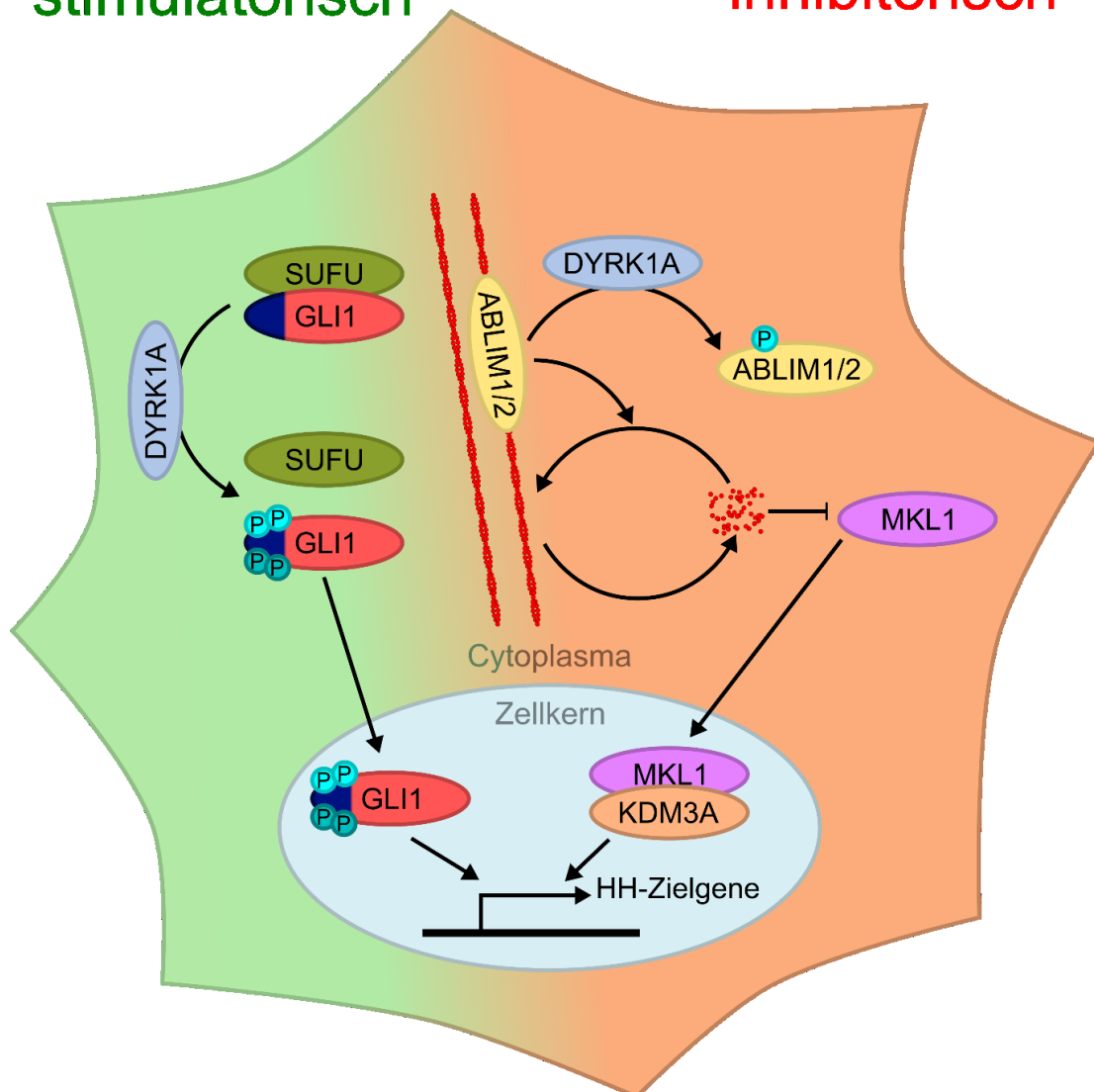


Abbildung 5.4: Angenommenes Schema der Effekte von DYRK1A auf den Hedgehog-Signalweg. DYRK1A kann sowohl stimulierend, wie auch inhibierend auf den HH-Signalweg einwirken. Der stimulatorische Einfluss ist grün unterlegt. DYRK1A phosphoryliert mindestens eines der Serine 102, 104, 130 oder 132, was zu einer Translokation von GLI1 in den Zellkern (hellblau) führt. Neben der reinen Translokation in den Kern hat DYRK1A noch aktivierende Effekte auf GLI1 unabhängig von der Translokation. Außerdem führt DYRK1A zu einer Dissoziation von SUFU von GLI1 in Abhängigkeit seiner Kinasefunktion, aber unabhängig von einer Phosphorylierung von Serin 102 oder 130. Als Grundlage für den inhibitorischen Effekt von DYRK1A auf den HH-Signalweg dient die Interaktion von MKL1 mit KDM3A. Dieses Dimer führt zu einer Demethylierung von H3K9 (Lockman et al., 2007) von HH-Zielgenen und damit zu deren Transkription. DYRK1A führt zu einer Phosphorylierung von ABLIM1 (und möglicherweise ABLIM2), was zu einem Lösen des Proteins vom AKTIN-Zytoskelett führt. Die nicht mehr vorhandene Stabilisierung des F-AKTINS durch ABLIM1 führt zu einer Anreicherung von G-AKTIN und zu einer Inhibition von MKL1 und damit von KDM3A. Die ausbleibende Demethylierung der Zielgene führt zu einer abgeschwächten HH-Aktivität.

5.8 Ausblick

Diese Arbeit zeigt eine bipolare Wirkung von DYRK1A auf den HH-Signalweg. Der bereits beschriebene positive Einfluss auf die Aktivität von GLI1 und damit auf den ganzen Signalweg konnte bestätigt und weiter charakterisiert werden. Die Identifikation der

Phosphorylierungsstellen durch DYRK1A in GLI1 ist essentiell für die genaue Untersuchung des Mechanismus und damit für die Entwicklung von Therapeutika zur Behandlung von Krebsformen in denen DYRK1A einen solchen stimulierenden Einfluss auf den HH-Signalweg besitzt. Weiterhin wurde zum ersten Mal ein inhibierender Effekt der Kinase auf die Expression von HH-Zielgenen gezeigt. Die vielversprechende Hypothese, dass dieser Effekt über ABLIM1/2, MKL1 und KDM3A vermittelt wird, zeigt, dass es (mindestens) zwei unabhängige Kaskaden gibt, die durch DYRK1A beeinflusst werden und zusätzlich Einfluss auf die HH-Zielgenexpression und damit auf die Entstehung diverser Krebsarten haben. Weiterhin wird zum ersten Mal ein funktioneller Zusammenhang zwischen dem HH-Signalweg und dem transkriptionellen Koaktivator MKL1 geliefert und damit das Feld der MKL1-regulierten Genexpression um einen weiteren großen Bereich erweitert. In Zukunft wird es von Bedeutung sein, den inaktivierenden Weg weiter zu charakterisieren und die Relevanz dieser Erkenntnisse *in vivo* zu bestimmen. Diese Arbeit bietet einen Grundstein für weitere Untersuchungen und damit für die Entwicklung gezielter Therapien für Tumore, die durch eine Deregulation dieses Gleichgewichtes entstehen.

6 Anhang

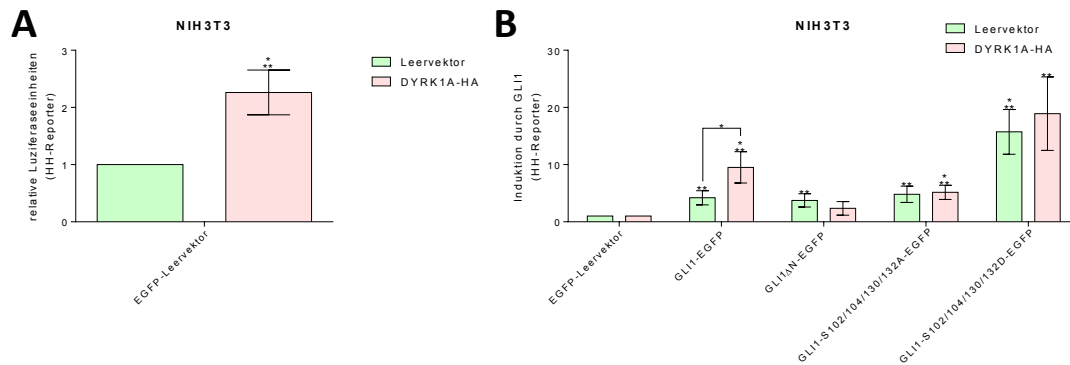


Abbildung 6.1: DYRK1A phosphoryliert GLI1. (A) Effekt von DYRK1A-HA auf den 12xGliLuc-Reporter für HH-Aktivität im Luziferaseexperiment in NIH3T3-Zellen. (B) Effekt von DYRK1A-HA auf den 12xGliLuc-Reporter in Kombination mit GLI1-EGFP, GLI1ΔN-EGFP, der nicht-phosphorylierbaren Mutante GLI1-S102/104/130/132A-EGFP und der Mutante GLI1-S102/104/130/132D-EGFP, die eine Phosphorylierung nachahmt in NIH3T3-Zellen. ****: $p < 0,0001$; ***: $p < 0,001$; **: $p < 0,01$; *: $p < 0,05$; signifikanter Unterschied zur Kontrollprobe ((A) EGFP-Leervektor mit Leervektor; (B) EGFP-Leervektor mit jeweiligem DYRK1A-Konstrukt); t-Test; $n = 4$.

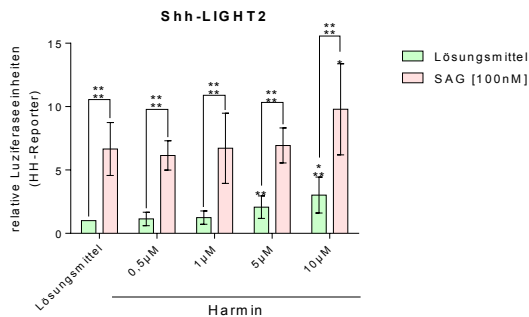


Abbildung 6.2: Einfluss des DYRK1A-Inhibitors Harmin auf den HH-Signalweg. Einfluss einer Inhibition des endogenen DYRK1A durch Harmin auf die Stimulation des HH-Signalwegs mittels SAG in Shh-LIGHT2-Zellen in Medium mit 1 % FBS. ****: $p < 0,0001$; ***: $p < 0,001$; **: $p < 0,01$; *: $p < 0,05$; signifikanter Unterschied zur Kontrollprobe (Lösungsmittel für Harmin jeweils mit oder ohne SAG-Behandlung); t-Test; $n = 9$.

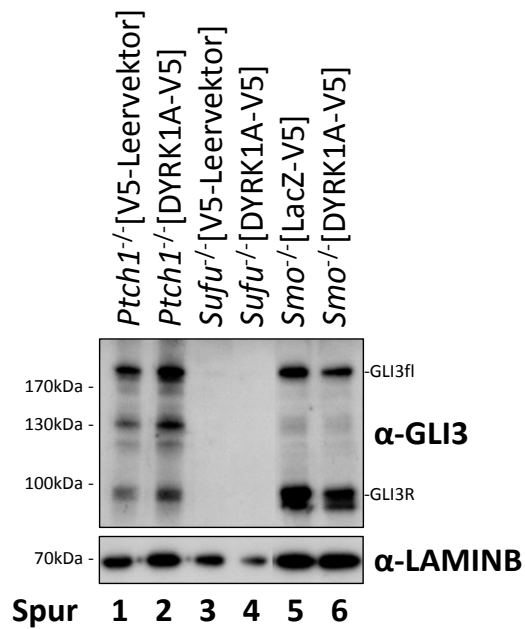


Abbildung 6.3: Stabile Überexpression von DYRK1A führt zu keiner veränderten GLI3-Prozessierung in MEF-Zellen mit aktivem HH-Signalweg. Analyse der Proteinmengen von GLI3 und GLI3R in *Ptch1*^{-/-} [V5-Leervektor], *Ptch1*^{-/-} [DYRK1A-V5], *Sufu*^{-/-} [V5-Leervektor], *Sufu*^{-/-} [DYRK1A-V5], *Smo*^{-/-} [LacZ-V5], *Smo*^{-/-} [DYRK1A-V5]. LAMINB dient als Ladekontrolle.

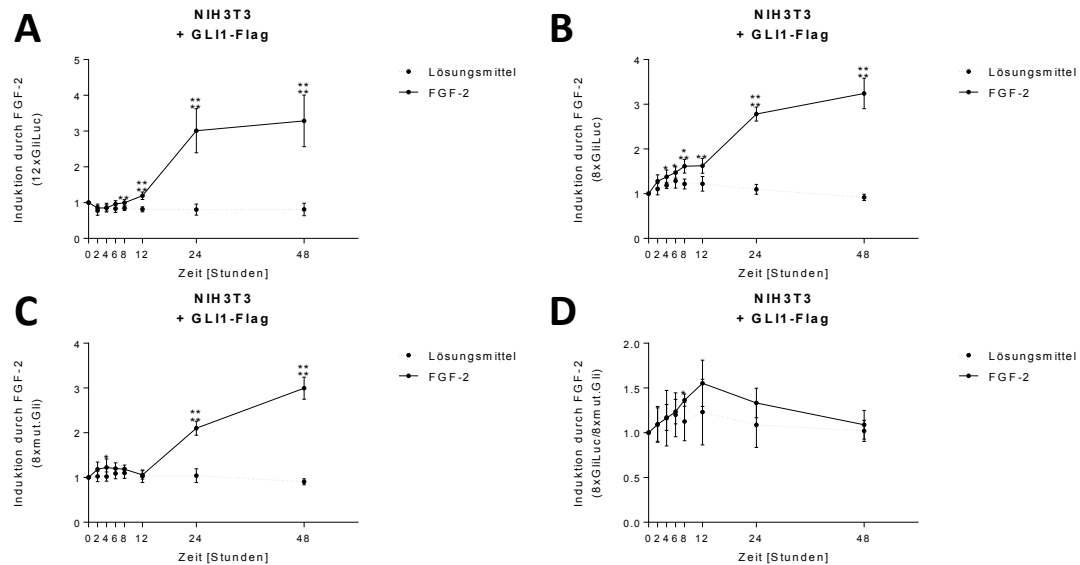


Abbildung 6.4: Zeitanhängiger Einfluss von FGF-2 in Kombination mit GLI1-Flag auf verschiedene Reporter im Luziferaseexperiment. (A) Einfluss auf den HH-Reporter 12xGliLuc nach 0 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h, 24 h oder 48 h Behandlung mit 10 ng/ μ l FGF-2 in NIH3T3-Zellen nach transients Transfektion mit GLI1-Flag. (B) Einfluss auf den HH-Reporter 8xGliLuc nach 0 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h, 24 h oder 48 h Behandlung mit 10 ng/ μ l FGF-2 in NIH3T3-Zellen nach transients Transfektion mit GLI1-Flag. (C) Einfluss auf den HH-Reporter 8xmut.Gli nach 0 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h, 24 h oder 48 h Behandlung mit 10 ng/ μ l FGF-2 in NIH3T3-Zellen nach transients Transfektion mit GLI1-Flag. (D) Verechnung der Luziferaseaktivitäten von 8xGliLuc (B) und 8xmut.Gli (C). ****: $p < 0,0001$; ***: $p < 0,001$; **: $p < 0,01$; *: $p < 0,05$; signifikanter Unterschied zur Kontrollprobe (Lösungsmittel zu jeweiligem Zeitpunkt); t-Test; $n = 6$.

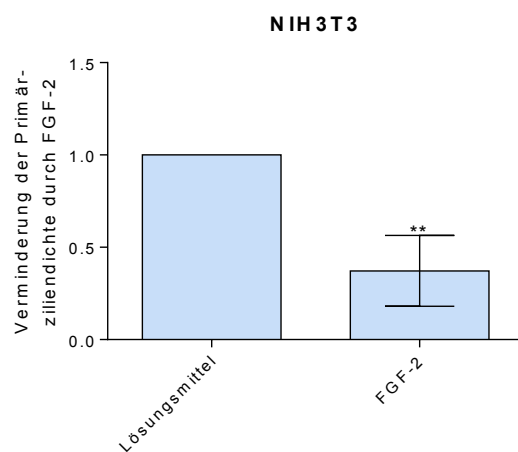


Abbildung 6.5: Reduktion der Primärziliendichte durch FGF-2. NIH3T3-Zellen wurden mit 10 ng/ μ l FGF-2 beziehungsweise dem Solvens behandelt, fixiert, die Primärzilien mit einem Antikörper gegen acetyliertes sowie detyronisiertes Tubulin gefärbt und gezählt. Die relative Menge an Zilien in mit Solvens behandelten Zellen wurde auf 1 gesetzt. Drei unabhängige Experimente wurden miteinander verrechnet. ****: $p < 0,0001$; ***: $p < 0,001$; **: $p < 0,01$; *: $p < 0,05$; signifikanter Unterschied zur Kontrollprobe (Lösungsmittel); t-Test; $n = 3$.

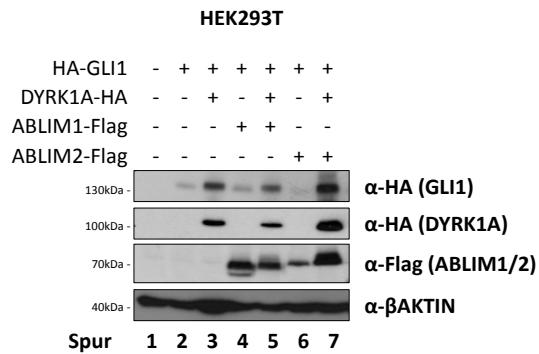


Abbildung 6.6: DYRK1A führt zu einem veränderten Laufverhalten von ABLIM1-Flag und ABLIM2-Flag im Westernblot. HEK293T-Zellen wurden mit den angegebenen Kombinationen aus HA-GLI1, DYRK1A-HA, ABLIM1-Flag und ABLIM2-Flag transfiziert und Gesamtzellextrakte erstellt. Die Expression der Proteine wurde mittels Westernblot nachgewiesen. βAKTIN ist als Ladekontrolle gezeigt.

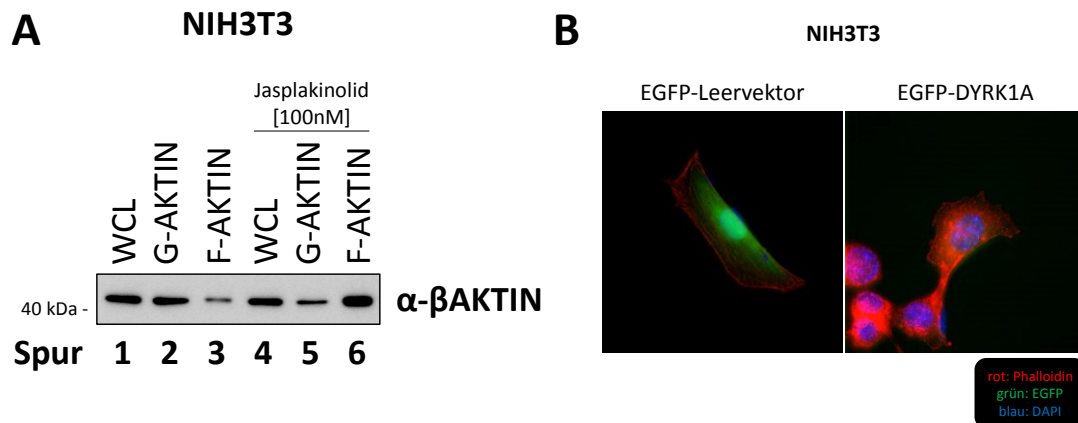


Abbildung 6.7: DYRK1A destabilisiert das AKTIN-Zytoskelett. (A) NIH3T3-Zellen wurden für 30 min mit Solvens oder 100 nM Jasplakinolid behandelt. Anschließend wurden F- und G-AKTIN voneinander getrennt und die Fraktionen mittels Westernblot analysiert. (B) Texas Red-Phalloidin-Färbung von NIH3T3-Zellen, die transient mit EGFP-DYRK1A oder einem EGFP-Leervektor transfiziert wurden. Phalloidin ist in rot, EGFP in grün und die Gegenfärbung der Kerne mit DAPI in blau gezeigt.

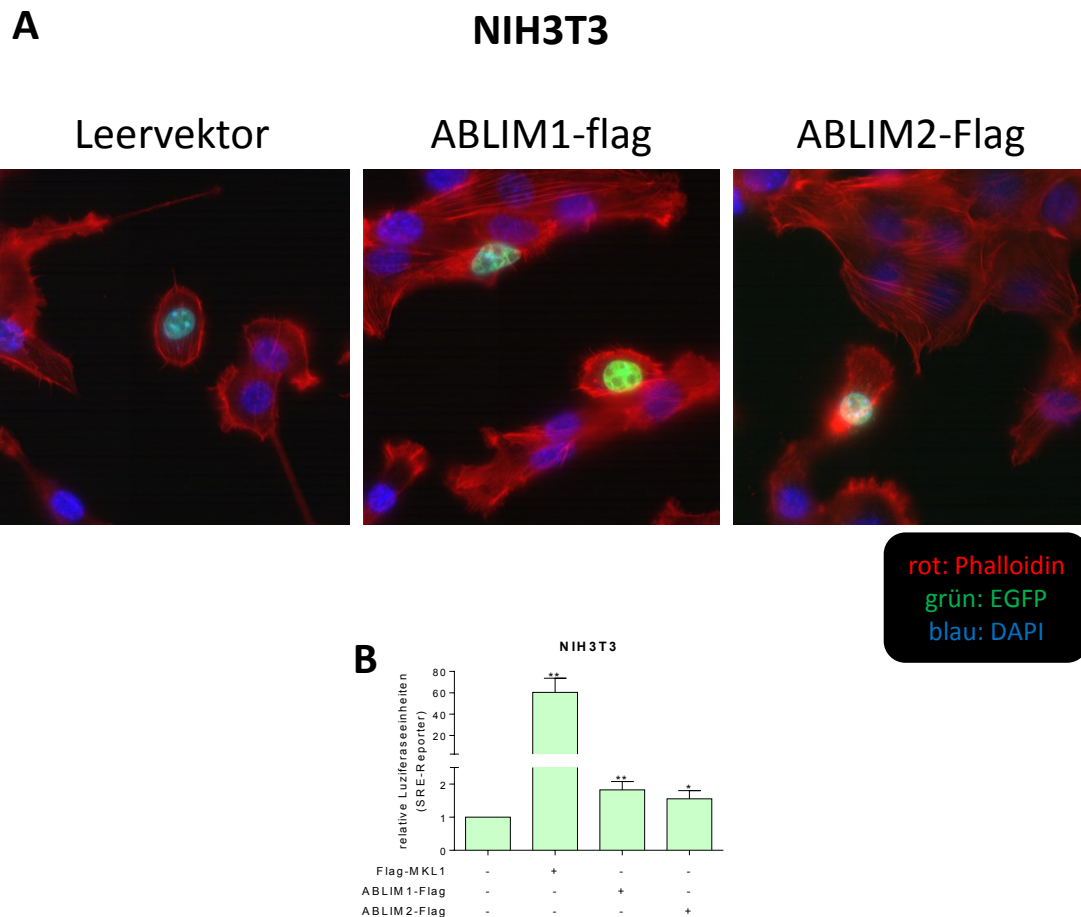


Abbildung 6.8: ABLIM1 und ABLIM2 stabilisieren F-AKTIN. (A) NIH3T3-Zellen wurden mit ABLIM1-Flag, ABLIM2-Flag oder einem Leervektor jeweils in Kombination mit PGK-H2B-EGFP kotransfiziert und nach Protokoll fixiert und mit California Red-Phalloidin gefärbt. Phalloidin ist in rot, EGFP in grün und die Gegenfärbung der Kerne mit DAPI in blau gezeigt. (B) Luziferaseexperiment mit NIH3T3-Zellen und dem SRE-Reporter SRE-Luc. Die Zellen wurden mit pFlag-MKL1, ABLIM1-Flag und ABLIM2-Flag transfiziert und die Luziferaseaktivität gemessen. ****: $p < 0,0001$; ***: $p < 0,001$; **: $p < 0,01$; *: $p < 0,05$; signifikanter Unterschied zur Kontrollprobe (Leervektor); t-Test; $n = 3$

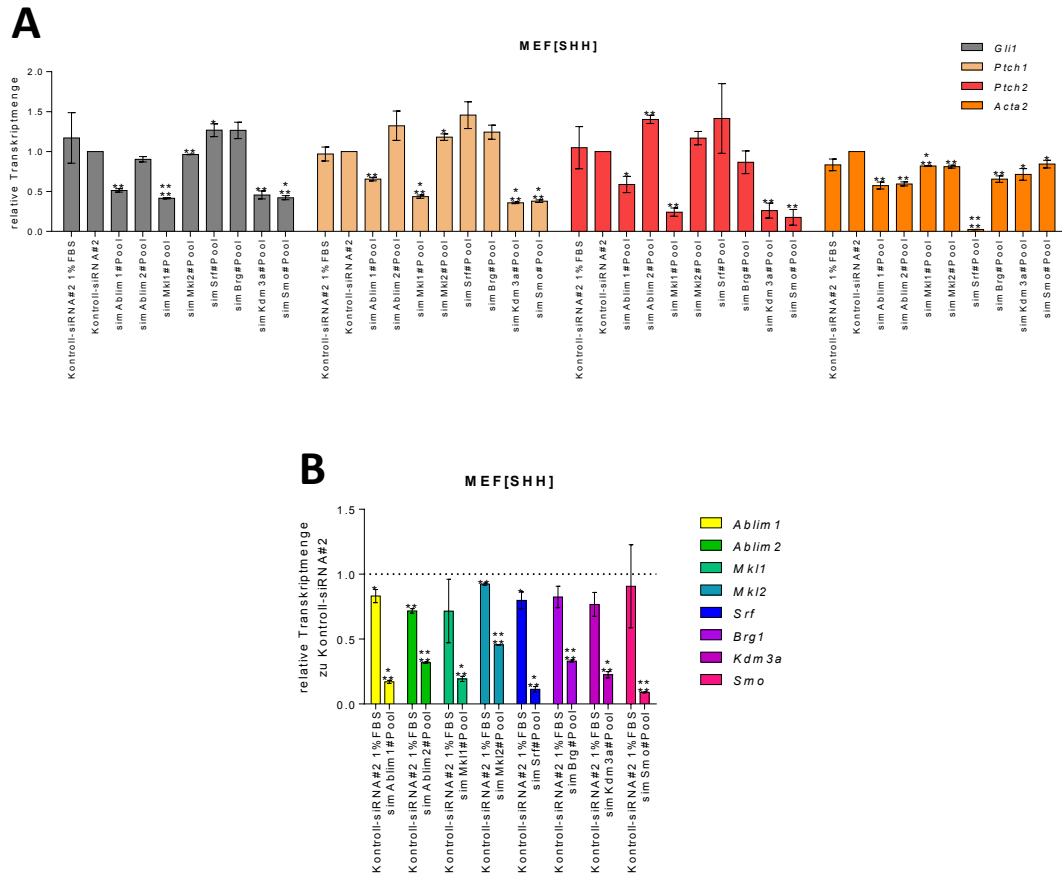


Abbildung 6.9: KDM3A beeinflusst den HH-Signalweg ähnlich wie MKL1 und ABLIM1 und 2. (A) Quantitative RT-PCR von MEF[SHH] nach „Knockdown“ von *Ablim1*, *Ablim2*, *Mkl1*, *Mkl2*, *Srf*, *Brg1*, *Kdm3a* oder *Smo* in Vollmedium. Die relativen Transkriptmengen von *Gli1*, *Ptch1*, *Ptch2* und *Acta2* wurden gemessen und in Relation zur Kontroll-siRNA#2 mit 1 % FBS gesetzt. (B) Messung der mittels siRNA depletierten mRNA-Level aus (A). ****: $p < 0,0001$; ***: $p < 0,001$; **: $p < 0,01$; *: $p < 0,05$; signifikanter Unterschied zur Kontrollprobe (Kontroll-siRNA#2); t-Test; $n = 2$.

7 Abkürzungsverzeichnis

Aminosäuren und Nukleotide wurden im Einbuchstabencode abgekürzt.

Abkürzung	Bedeutung
%	Prozent
(w/v)	"Weight per volume"
× g	-fache Erdbeschleunigung
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
µmol	Mikromol
ABLIM	AKTIN-bindendes LIM Protein
ABLIM1	AKTIN-bindendes LIM Protein 1
ABLIM2	AKTIN-bindendes LIM Protein 2
ABLIM3	AKTIN-bindendes LIM Protein 3
AC	Adenylylzyklase
ACIII	Adenylylzyklase III
ACTA2	„Smooth-muscle actin“
APS	Ammoniumpersulfat
ARIP4	„Androgen receptor-interacting protein 4“
ARP2/3	„Actin-related protein 2/3“
ATM	„Ataxia telangiectasia mutated“
ATP	Adenosintriphosphat
B1, B2 und B3	basische Boxen
BCC	Basalzellkarzinomen
BCL2	„B cell leukemia/lymphoma 2“
BCNS	Basalzellnävus-Syndrom (=Gorlin-Syndrom)
BDNF	„Brain-derived neurotrophic factor“
BMP	„Bone morphogenic protein“
BOC	„Brother of CDO“
bp	Basenpaare
BRG1	„Brahma related gene 1“
BSA	Bovines Serumalbumin

<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CASP9	Caspase 9
CCND1	„Cyclin D1“
CDC2	„Cyclin-dependent protein kinase Cdk1/Cdc2“
CDC42	„Cell division cycle 42“
CDK	Cyclin-abhängige Kinase
cDNA	komplementäre DNA
CDO	„CAM-related/downregulated by oncogenes“
CKI	Caseinkinase I
CkII	Caseinkinase II
CkIα	Caseinkinase I α
cm	Zentimeter
CREB	„cAMP response element binding protein“
Ct	„Cycle threshold“
C-Terminus	Carboxyterminus
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenylindol
DH	DYRK-Homologiebox
DHH	„Desert Hedgehog“
DISP	„Dispatched“
DMEM	„Dulbecco's Modified Eagle Medium“
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSCR	Down-Syndrom-kritische Region
DTT	Dithiothreitol
DYRK	„Dual specificity tyrosine-phosphorylation regulated“ Kinase
DYRK1A	„Dual specificity tyrosine-phosphorylation regulated“ Kinase 1A
DYRK1B	„Dual specificity tyrosine-phosphorylation regulated“ Kinase 1B
DYRK2	„Dual specificity tyrosine-phosphorylation regulated“ Kinase 2
DYRK3	„Dual specificity tyrosine-phosphorylation regulated“ Kinase 3
DYRK4	„Dual specificity tyrosine-phosphorylation regulated“ Kinase 4
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECAD	E-Cadherin

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EDVP	EDD, DDB1 und VPRBP
EGF	epithelialer Wachstumsfaktor
EGFP	„enhanced GFP“
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EMT	epithelial-mesenchymale-Transition
ER	endoplasmatischen Retikulum
ERK1/2	„Extracellular-signal regulated kinase 1/2“
<i>et al.</i>	und andere
EVC	Ellis-van Creveld Syndrom Protein
EVC2	Ellis-van Creveld Syndrom Protein 2
F	F-AKTIN
F-AKTIN	filamentäres AKTIN
FBS	Fetales Kälberserum
FGF	Fibroblasten Wachstumsfaktor
FGF-2	Basischer Fibroblastenwachstumsfaktor
FGFR	FGF-Rezeptor
FHL2	„Four and a half LIM domains 2“
g	Gramm
G	G-AKTIN
G418	Geneticindisulfat
G-AKTIN	globuläres AKTIN
GAS1	„Growth arrest-specific“
GATA1	„GATA-binding factor 1“
GATA4	„GATA-binding factor 4“
GBD	GTPase-Bindedomäne
GCP	„Granule cell precursor“
GFP	grün-fluoreszierende Protein
GIST	gastrointestinale stromaähnliche Tumoren
GLI1	„GLI-Kruppel family member GLI1“, „GLI family zinc finger 1“
GLI1^{fl}	GLI1 mit voller Länge
GLI1^{R701G}	durch RNA-Editierung verändertes GLI1 (Arginin 701 zu Glycin)
GLI1ΔN	N-terminal trunkierte Variante von GLI1
GLI2	„GLI-Kruppel family member GLI1“, „GLI family zinc finger 2“
GLI2A	Aktivatorform von GLI2

GLI2R	Repressorform von GLI2
GLI3	„GLI-Kruppel family member GLI1“, „GLI family zinc finger 3“
GLI3A	Aktivatorform von GLI3
GLI3R	Repressorform von GLI3
GPC3	Glypikan 3
GPC5	Glypikan 5
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GPR161	G-Protein-gekoppelter Rezeptor 161
GPRK2	GPCR-Kinase 2
GREM1	Gremlin 1
GSK3	Glykogensynthase-Kinase 3
GSK3β	Glykogensynthase-Kinase 3 β
h	Stunde(n)
H3K9	Lysin 9 von Histon 3
HAN11	„Human homologue of anthocyanin 11“
HDAC5	Histondeacetylase 5
HDAC9	Histondeacetylase 9
HH	„Hedgehog“
HH-C	C-terminaler Teil der HH-Liganden
HHIP	HH-interagierendes Protein
HH-N	N-terminaler Teil der HH-Liganden
HIP1	„Huntingtin interacting protein 1“
HIPKs	Homöodomän-Kinasen
IDCR	Ionic Detergent Compatibility Reagent
IEG	„Immediate early gene“
IGF2	„Insulin-like growth factor 2“
IHH	„Indian Hedgehog“
IMT	Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung (Universität Marburg)
IP	Immunpräzipitation
ISL-1	ISLET-1
JUN	„Jun proto-oncogene“
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton

KDM3A	Lysin-spezifische Demethylase 3A
KIF7	Kinesin Familienmitglied 7
l	Liter
LAS	Lyse- und F-AKTIN-Stabilisierungs-Puffer
LB	„Lysogeny broth“
LMO	„LIM domain only“
m	Meter
M	Molar
mA	Milliampère
MAP2K1	„Mitogen-activated protein kinase kinase 1“
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MBK-2	„Minibrain kinase homologue-2“
MBOAT	membrangebundene O-Acetyltransferase
MEF	embryonale Mausfibroblasten
min	Minute(n)
MKK3	„Mitogen-activated protein kinase kinase 3“
MKL1	„Megakaryoblastic leukemia 1“ (alternativ: BSAC, MAL, MRTF-A)
MKL2	„Megakaryoblastic leukemia 2“ (alternativ: MAL16, MRTF-B)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mmol	Millimol
mol	Mol
MP	Milchpulver
mRNA	„Messenger“ RNA
MYC	„v-Myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog“
MYOCD	Myocardin
n	Anzahl an unabhängigen Experimenten
NAPA	akzessorische N-terminale Autophosphorylierungsregion
NFAT	„Nuclear factor of activated T-cells“
NGF	Nervenwachstumsfaktor
NKX2-5	„NK2 homeobox 5“
NLS	nukleäres Lokalisationssignal
nm	Nanometer

nM	Nanomolar
nmol	Nanomol
NP-40	Nonidet P-40
NRSF	„Neuron-restrictive silencing factor“
N-Terminus	Aminotermius
N-WASP	„Neuronal Wiskott-Aldrich syndrome protein“
OD₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
P0	„ribosomal protein, large, P0“
PBS	„Phosphate buffered saline“
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PDAC	duktales Adenokarzinom des Pankreas
PEI	Polyethylenimin
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität
PI4P	Phosphatidylinositol-4-Phosphat
PI4P	Phosphatidylinositol-4-Phosphat
PIAS	„Protein inhibitor of activated STAT“
PIPES	1,4-Piperazindiethanschwefelsäure
PKA	Proteinkinase A
Pka	Proteinkinase A
PLK	„Polo-like kinases“
pmol	Picomol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PMSF	Phenylmethylsulfonyl-fluorid
Pp1	Proteinphosphatasen 1
Pp2a	Proteinphosphatasen 2a
Pp4	Proteinphosphatasen 4
PRP4	pre-mRNA prozessierende Protein 4 Kinase
PTCH1	„Patched 1“
PTCH2	„Patched 2“
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	quantitativer Echtzeit-PCR
RAC1	Ras-verwandtes C3 Botulinumtoxinsubstrat 1
RASL11B	„RAS-like, family 11, member B“
RCK	Kinasen benannt nach dem Gen <i>Rck</i> aus <i>Mus musculus</i>
rDNase	rekombinante DNase

REST	„Repressor element 1 silencing transcription factor“
RHO	Ras homologe GTPase
RHOA	Ras homologe GTPase A
RISC	„RNA-induced silencing complex“
RNA	Ribonukleinsäure
RND	„Resistance-nodulation-division“
ROCK	„RHO associated protein kinase“
rpm	Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde(n)
<i>S. pombe</i>	<i>Schizosacharomyces pombe</i>
SAF-A	„Scaffold attachment factor A“
SAG	„Smoothened Agonist“
SAP	SAF-A, Acinus und PIAS
SCLC	kleinzelliger Lungenkrebs
SCUBE2	„Signal peptide, CUB domain, EGF-like 2“
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SFK	Kinase der SRC-Familie
SHH	„Sonic Hedgehog“
siRNA	„small interfering RNA“
SIRT1	Sirtuin-1
SKI	„Skinny Hedgehog“
SM22	Taglin
SMA	„Smooth-muscle actin“
SMC	Zelle der glatten Muskulatur
SMO	„Smoothened“
SMOM2	konstitutiv aktives SMO
SNAIL1	„Snail family zinc finger 1“
SRC	„v-src avian sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog“
SRE	„Serum response element“
SRF	„Serum response factor“
SRSF2	„Serine/arginine-rich splicing factor 2“
SSD	„Sterol-sensing“ Domäne
STARS	„Striated muscle activator of RHO signaling“

SUFU	„Suppressor of fused“
SV40	Simian-Virus 40
SWI/SNF	„Switch/Sucrose non-fermenting“
TAE	Tris-Acetat EDTA
TBS-T	„Tris buffered saline with Tween“
TCF	„Ternary complex factor“
TCTN1	„Tectonic 1“
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TERT	„Telomerase reverse transcriptase“
TGFβ	Transformierender Wachstumsfaktor β
TK	Thymidinkinase
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TULP3	„Tubby-related protein 3“
U	Unit
VCA	Verprolin, Cofilin, „Acidic“
VEGF	„Vascular endothelial growth factor“
VHD	„Villin head piece domain“
WIF1	„WNT inhibitory factor 1“
WNT1	Wortkreuzung aus WG für Wingless und INT1 für Integration 1
\bar{x}	arithmetisches Mittel
XPO1	Exportin 1
YY1	Yin Yang-1
ZNS	zentrales Nervensystem
ρ	Konzentration

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1: Die <i>hedgehog</i> -Mutante von <i>Drosophila melanogaster</i> .	3
Abbildung 2.2: Die Reifung des HH-Liganden.	7
Abbildung 2.3: Schematischer Ablauf des HH-Signalwegs vor und nach Bindung eines HH-Liganden (hier SHH) an den Rezeptor PTCH1.	11
Abbildung 2.4: Schema der zwei Modelle der ligandenabhängigen parakrin vermittelten Antwort in Tumorzellen.	12
Abbildung 2.5: Schematische Darstellung der Proteinstruktur der 5 DYRK-Familienmitglieder in Säugetieren.	15
Abbildung 2.6: Proteinstruktur von murinem MKL1 und MKL2.	26
Abbildung 3.1: Thermales Profil einer qPCR mit einer Schmelztemperatur von 65 °C.	80
Abbildung 4.1: Einfluss von DYRK-Familienmitgliedern auf GLI1 und GLI2.	90
Abbildung 4.2: DYRK1A phosphoryliert GLI1.	93
Abbildung 4.3: SUFU inhibiert die DYRK1A-vermittelte Aktivierung von GLI1.	94
Abbildung 4.4: Modifikation der Interaktion von SUFU und GLI1 durch DYRK1A.	95
Abbildung 4.5: Einfluss des DYRK1A-Inhibitors Harmin auf den HH-Signalweg.	97
Abbildung 4.6: Depletion von DYRK1A zeigt keinen Effekt auf die HH-Aktivität in den humanen Zelllinien HEK293T und SU.86.86.	99
Abbildung 4.7: Depletion von DYRK1A zeigt keinen Effekt auf die HH-Aktivität in MEF-Zellen mit aktivem HH-Signalweg.	100
Abbildung 4.8: Depletion von DYRK1A beeinflusst die HH-Aktivität in neuronalen Tumorzellen.	102
Abbildung 4.9: Stabile Überexpression von DYRK1A führt zu einer Inhibition der HH-Aktivität in MEF-Zellen mit aktivem HH-Signalweg, aber hat keinen Einfluss auf die basale Aktivität.	103
Abbildung 4.10: Einfluss von FGF-2 auf den HH-Signalweg im Luziferaseexperiment.	105
Abbildung 4.11: Zeitabhängiger Einfluss von FGF-2 auf verschiedene Reporter im Luziferaseexperiment.	106
Abbildung 4.12: Einfluss von FGF-2 auf die Transkriptlevel von <i>Gli1</i> .	107
Abbildung 4.13: FGF-2 inhibiert die SAG-vermittelte Erhöhung der Luziferaseaktivität in Shh-LIGHT2-Zellen.	108
Abbildung 4.14: FGF-2 vermindert die Zielgentranskription bei aktivem HH-Signalweg.	109
Abbildung 4.15: Einfluss von Harmin auf die FGF-2-vermittelten Effekte auf den HH-Signalweg.	110
Abbildung 4.16: DYRK1A interagiert mit und phosphoryliert ABLIM1.	111
Abbildung 4.17: DYRK1A destabilisiert das AKTIN-Zytoskelett.	112

Abbildung 4.18: ABLIM1 und ABLIM2 stabilisieren F-AKTIN.....	115
Abbildung 4.19: ABLIMs wirken positiv auf den HH-Signalweg.	117
Abbildung 4.20: KDM3A beeinflusst den HH-Signalweg ähnlich wie MKL1 und ABLIM1 und 2.	119
Abbildung 5.1: Serin 102, 104, 130 und 132 in GLI1 sind von Bedeutung für dessen Aktivierung durch DYRK1A.	123
Abbildung 5.2: DYRK1A führt zu einer Auflösung des SUFU-GLI1-Komplexes.	124
Abbildung 5.3: Angenommenes Modell der Aktivierung von SRF über die ABLIM-Proteine 2 und 3 in gestreiften Muskelzellen.	130
Abbildung 5.4: Angenommenes Schema der Effekte von DYRK1A auf den Hedgehog-Signalweg.	133
Abbildung 6.1: DYRK1A phosphoryliert GLI1.	135
Abbildung 6.2: Einfluss des DYRK1A-Inhibitors Harmin auf den HH-Signalweg.....	135
Abbildung 6.3: Stabile Überexpression von DYRK1A führt zu keiner veränderten GLI3- Prozessierung in MEF-Zellen mit aktivem HH-Signalweg.	136
Abbildung 6.4: Zeitanhängiger Einfluss von FGF-2 in Kombination mit GLI1-Flag auf verschiedene Reporter im Luziferaseexperiment.	137
Abbildung 6.5: Reduktion der Primärziliendichte durch FGF-2.	137
Abbildung 6.6: DYRK1A führt zu einem veränderten Laufverhalten von ABLIM1-Flag und ABLIM2-Flag im Westernblot.	138
Abbildung 6.7: DYRK1A destabilisiert das AKTIN-Zytoskelett.	138
Abbildung 6.8: ABLIM1 und ABLIM2 stabilisieren F-AKTIN.....	139
Abbildung 6.9: KDM3A beeinflusst den HH-Signalweg ähnlich wie MKL1 und ABLIM1 und 2.	140

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1: Volumen an Vollmedium für die entsprechenden Zellkulturformate.....	57
Tabelle 3.2: Zusammensetzung der PCR für den Mykoplasmentest.	59
Tabelle 3.3: Temperaturschritte für die PCR des Mykoplasmentests.....	59
Tabelle 3.4: Volumina der für die transiente Transfektion mit PEI verwendeten Reagenzien in Abhängigkeit des Zellkulturformats.	60
Tabelle 3.5: Volumina der für die transiente Transfektion mit X-tremeGENE HP verwendeten Reagenzien in Abhängigkeit des Zellkulturformats.	61
Tabelle 3.6: Volumina der für die Transfektion von siRNA mit DharmaFECT 1 verwendeten Reagenzien in Abhängigkeit des Zellkulturformats.	63
Tabelle 3.7: Volumina der für die Transfektion von siRNA mit Lipofectamine® RNAiMAX verwendeten Reagenzien in Abhängigkeit des Zellkulturformats.	64
Tabelle 3.8: Verlauf einer typischen Polymerase-Ketten-Reaktion.	69
Tabelle 3.9: Pipettierschemata der verschiedenen Polymerase-Ketten-Reaktionen.	70
Tabelle 3.10: PCR Programm zu Klonierung von pEF-DYRK2.	75
Tabelle 3.11: PCR Programm zu Klonierung von pEF-DYRK3.	75
Tabelle 3.12: PCR Programm zu Klonierung von pEF-DYRK4.	76
Tabelle 3.13: Pipettierschema der cDNA-Synthese mit Omniscript™ RT200.	77
Tabelle 3.14: Pipettierschema der cDNA-Synthese mit iScript™ cDNA Synthesis Kit.	77
Tabelle 3.15: Temperaturprogramm der cDNA-Synthese mit iScript™ cDNA Synthesis Kit.	78
Tabelle 3.16: Pipettierschema einer qPCR.	79
Tabelle 3.17: Temperaturschema einer qPCR.	79
Tabelle 3.18: Verwendete Volumina an Lysepuffer.....	82
Tabelle 3.19: Volumina an LAS für die Fraktionierung von G-AKTIN und F-AKTIN.....	85

10 Literaturverzeichnis

- Adayev, T., M.C. Chen-Hwang, N. Murakami, E. Lee, D.C. Bolton und Y.W. Hwang. 2007. Dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 1A does not require tyrosine phosphorylation for activity in vitro. *Biochemistry*. 46:7614-7624.
- Alcedo, J., M. Ayzenzon, T. Von Ohlen, M. Noll und J.E. Hooper. 1996. The *Drosophila* smoothed gene encodes a seven-pass membrane protein, a putative receptor for the hedgehog signal. *Cell*. 86:221-232.
- Allen, B.L., J.Y. Song, L. Izzi, I.W. Althaus, J.S. Kang, F. Charron, R.S. Krauss und A.P. McMahon. 2011. Overlapping roles and collective requirement for the coreceptors GAS1, CDO, and BOC in SHH pathway function. *Developmental cell*. 20:775-787.
- Alvarez, M., X. Altafaj, S. Aranda und S. de la Luna. 2007. DYRK1A autophosphorylation on serine residue 520 modulates its kinase activity via 14-3-3 binding. *Molecular biology of the cell*. 18:1167-1178.
- Alvarez, M., X. Estivill und S. de la Luna. 2003. DYRK1A accumulates in splicing speckles through a novel targeting signal and induces speckle disassembly. *Journal of cell science*. 116:3099-3107.
- Amable, L., E. Gavin, K. Kudo, E. Meng, R.P. Rocconi, L.A. Shevde und E. Reed. 2014. GLI1 upregulates C-JUN through a specific 130-kDa isoform. *International journal of oncology*. 44:655-661.
- Amanai, K. und J. Jiang. 2001. Distinct roles of Central missing and Dispatched in sending the Hedgehog signal. *Development*. 128:5119-5127.
- Aranda, S., M. Alvarez, S. Turro, A. Laguna und S. de la Luna. 2008. Sprouty2-mediated inhibition of fibroblast growth factor signaling is modulated by the protein kinase DYRK1A. *Molecular and cellular biology*. 28:5899-5911.
- Aranda, S., A. Laguna und S. de la Luna. 2011. DYRK family of protein kinases: evolutionary relationships, biochemical properties, and functional roles. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 25:449-462.
- Aravind, L. und E.V. Koonin. 2000. SAP - a putative DNA-binding motif involved in chromosomal organization. *Trends in biochemical sciences*. 25:112-114.
- Arron, J.R., M.M. Winslow, A. Polleri, C.P. Chang, H. Wu, X. Gao, J.R. Neilson, L. Chen, J.J. Heit, S.K. Kim, N. Yamasaki, T. Miyakawa, U. Francke, I.A. Graef und G.R. Crabtree. 2006. NFAT dysregulation by increased dosage of DSCR1 and DYRK1A on chromosome 21. *Nature*. 441:595-600.
- Arsenian, S., B. Weinhold, M. Oelgeschlager, U. Ruther und A. Nordheim. 1998. Serum response factor is essential for mesoderm formation during mouse embryogenesis. *The EMBO journal*. 17:6289-6299.
- Asparuhova, M.B., J. Ferralli, M. Chiquet und R. Chiquet-Ehrismann. 2011. The transcriptional regulator megakaryoblastic leukemia-1 mediates serum response factor-independent activation of tenascin-C transcription by mechanical stress. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 25:3477-3488.
- Baarlink, C., H. Wang und R. Grosse. 2013. Nuclear actin network assembly by formins regulates the SRF coactivator MAL. *Science*. 340:864-867.
- Bahler, J. und P. Nurse. 2001. Fission yeast Pom1p kinase activity is cell cycle regulated and essential for cellular symmetry during growth and division. *The EMBO journal*. 20:1064-1073.
- Bai, C.B. und A.L. Joyner. 2001. Gli1 can rescue the in vivo function of Gli2. *Development*. 128:5161-5172.
- Bailey, J.M., A.M. Mohr und M.A. Hollingsworth. 2009. Sonic hedgehog paracrine signaling regulates metastasis and lymphangiogenesis in pancreatic cancer. *Oncogene*. 28:3513-3525.

- Bain, J., L. Plater, M. Elliott, N. Shpiro, C.J. Hastie, H. McLauchlan, I. Klevernic, J.S. Arthur, D.R. Alessi und P. Cohen. 2007. The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. *The Biochemical journal*. 408:297-315.
- Barrientos, T., D. Frank, K. Kuwahara, S. Bezprozvannaya, G.C. Pipes, R. Bassel-Duby, J.A. Richardson, H.A. Katus, E.N. Olson und N. Frey. 2007. Two novel members of the ABLIM protein family, ABLIM-2 and -3, associate with STARS and directly bind F-actin. *The Journal of biological chemistry*. 282:8393-8403.
- Barzi, M., D. Kostrz, A. Menendez und S. Pons. 2011. Sonic Hedgehog-induced proliferation requires specific Galpha inhibitory proteins. *The Journal of biological chemistry*. 286:8067-8074.
- Beachy, P.A., S.G. Hymowitz, R.A. Lazarus, D.J. Leahy und C. Siebold. 2010. Interactions between Hedgehog proteins and their binding partners come into view. *Genes & development*. 24:2001-2012.
- Beachy, P.A., S.S. Karhadkar und D.M. Berman. 2004. Tissue repair and stem cell renewal in carcinogenesis. *Nature*. 432:324-331.
- Becker, W. und H.G. Joost. 1999. Structural and functional characteristics of Dyrk, a novel subfamily of protein kinases with dual specificity. *Progress in nucleic acid research and molecular biology*. 62:1-17.
- Becker, W., Y. Weber, K. Wetzel, K. Eirnbter, F.J. Tejedor und H.G. Joost. 1998. Sequence characteristics, subcellular localization, and substrate specificity of DYRK-related kinases, a novel family of dual specificity protein kinases. *The Journal of biological chemistry*. 273:25893-25902.
- Benavides-Piccione, R., M. Dierssen, I. Ballesteros-Yanez, M. Martinez de Lagran, M.L. Arbones, V. Fotaki, J. DeFelipe und G.N. Elston. 2005. Alterations in the phenotype of neocortical pyramidal cells in the Dyrk1A+/- mouse. *Neurobiology of disease*. 20:115-122.
- Benazet, J.D., M. Bischofberger, E. Tiecke, A. Goncalves, J.F. Martin, A. Zuniga, F. Naef und R. Zeller. 2009. A self-regulatory system of interlinked signaling feedback loops controls mouse limb patterning. *Science*. 323:1050-1053.
- Benson, C.C., Q. Zhou, X. Long und J.M. Miano. 2011. Identifying functional single nucleotide polymorphisms in the human CArGome. *Physiological genomics*. 43:1038-1048.
- Bhatia, N., S. Thiagarajan, I. Elcheva, M. Saleem, A. Dlugosz, H. Mukhtar und V.S. Spiegelman. 2006. Gli2 is targeted for ubiquitination and degradation by beta-TrCP ubiquitin ligase. *The Journal of biological chemistry*. 281:19320-19326.
- Bigelow, R.L., N.S. Chari, A.B. Unden, K.B. Spurgers, S. Lee, D.R. Roop, R. Toftgard und T.J. McDonnell. 2004. Transcriptional regulation of bcl-2 mediated by the sonic hedgehog signaling pathway through gli-1. *The Journal of biological chemistry*. 279:1197-1205.
- Bijlsma, M.F., K.S. Borensztajn, H. Roelink, M.P. Peppelenbosch und C.A. Spek. 2007. Sonic hedgehog induces transcription-independent cytoskeletal rearrangement and migration regulated by arachidonate metabolites. *Cellular signalling*. 19:2596-2604.
- Bijlsma, M.F., H. Damhofer und H. Roelink. 2012. Hedgehog-stimulated chemotaxis is mediated by smoothened located outside the primary cilium. *Science signaling*. 5:ra60.
- Bijlsma, M.F., C.A. Spek, D. Zivkovic, S. van de Water, F. Rezaee und M.P. Peppelenbosch. 2006. Repression of smoothened by patched-dependent (pro-)vitamin D3 secretion. *PLoS biology*. 4:e232.
- Bogacheva, O., O. Bogachev, M. Menon, A. Dev, E. Houde, E.I. Valoret, H.M. Prosser, C.L. Creasy, S.J. Pickering, E. Grau, K. Rance, G.P. Livi, V. Karur, C.L. Erickson-Miller und D.M. Wojchowski. 2008. DYRK3 dual-specificity kinase attenuates erythropoiesis during anemia. *The Journal of biological chemistry*. 283:36665-36675.
- Bourikas, D., V. Pekarik, T. Baeriswyl, A. Grunditz, R. Sadhu, M. Nardo und E.T. Stoeckli. 2005. Sonic hedgehog guides commissural axons along the longitudinal axis of the spinal cord. *Nature neuroscience*. 8:297-304.

- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*. 72:248-254.
- Brewster, R., J.L. Mullor und A. Ruiz i Altaba. 2000. Gli2 functions in FGF signaling during antero-posterior patterning. *Development*. 127:4395-4405.
- Briscoe, J. und P.P. Therond. 2013. The mechanisms of Hedgehog signalling and its roles in development and disease. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 14:416-429.
- Brissault, B., A. Kichler, C. Guis, C. Leborgne, O. Danos und H. Cheradame. 2003. Synthesis of linear polyethylenimine derivatives for DNA transfection. *Bioconjugate chemistry*. 14:581-587.
- Bujak, M. und N.G. Frangogiannis. 2007. The role of TGF-beta signaling in myocardial infarction and cardiac remodeling. *Cardiovascular research*. 74:184-195.
- Busche, S., A. Descot, S. Julien, H. Genth und G. Posern. 2008. Epithelial cell-cell contacts regulate SRF-mediated transcription via Rac-actin-MAL signalling. *Journal of cell science*. 121:1025-1035.
- Callis, T.E., D. Cao und D.Z. Wang. 2005. Bone morphogenetic protein signaling modulates myocardial transactivation of cardiac genes. *Circulation research*. 97:992-1000.
- Campbell, L.E. und C.G. Proud. 2002. Differing substrate specificities of members of the DYRK family of arginine-directed protein kinases. *FEBS letters*. 510:31-36.
- Canettieri, G., L. Di Marcotullio, A. Greco, S. Coni, L. Antonucci, P. Infante, L. Pietrosanti, E. De Smaele, E. Ferretti, E. Miele, M. Pelloni, G. De Simone, E.M. Pedone, P. Gallinari, A. Giorgi, C. Steinkuhler, L. Vitagliano, C. Pedone, M.E. Schinin, I. Screpanti und A. Gulino. 2010. Histone deacetylase and Cullin3-REN(KCTD11) ubiquitin ligase interplay regulates Hedgehog signalling through Gli acetylation. *Nature cell biology*. 12:132-142.
- Canzonetta, C., C. Mulligan, S. Deutsch, S. Ruf, A. O'Doherty, R. Lyle, C. Borel, N. Lin-Marq, F. Delom, J. Groet, F. Schnappauf, S. De Vita, S. Averill, J.V. Priestley, J.E. Martin, J. Shipley, G. Denyer, C.J. Epstein, C. Fillat, X. Estivill, V.L. Tybulewicz, E.M. Fisher, S.E. Antonarakis und D. Nizetic. 2008. DYRK1A-dosage imbalance perturbs NRSF/REST levels, deregulating pluripotency and embryonic stem cell fate in Down syndrome. *American journal of human genetics*. 83:388-400.
- Cao, J., Y. Shen, L. Zhu, Y. Xu, Y. Zhou, Z. Wu, Y. Li, X. Yan und X. Zhu. 2012. miR-129-3p controls cilia assembly by regulating CP110 and actin dynamics. *Nature cell biology*. 14:697-706.
- Capurro, M.I., P. Xu, W. Shi, F. Li, A. Jia und J. Filmus. 2008. Glypican-3 inhibits Hedgehog signaling during development by competing with patched for Hedgehog binding. *Developmental cell*. 14:700-711.
- Cen, B., A. Selvaraj, R.C. Burgess, J.K. Hitzler, Z. Ma, S.W. Morris und R. Prywes. 2003. Megakaryoblastic leukemia 1, a potent transcriptional coactivator for serum response factor (SRF), is required for serum induction of SRF target genes. *Molecular and cellular biology*. 23:6597-6608.
- Chamoun, Z., R.K. Mann, D. Nellen, D.P. von Kessler, M. Bellotto, P.A. Beachy und K. Basler. 2001. Skinny hedgehog, an acyltransferase required for palmitoylation and activity of the hedgehog signal. *Science*. 293:2080-2084.
- Chan, M.W., F. Chaudary, W. Lee, J.W. Copeland und C.A. McCulloch. 2010. Force-induced myofibroblast differentiation through collagen receptors is dependent on mammalian diaphanous (mDia). *The Journal of biological chemistry*. 285:9273-9281.
- Chang, P.S., L. Li, J. McAnally und E.N. Olson. 2001. Muscle specificity encoded by specific serum response factor-binding sites. *The Journal of biological chemistry*. 276:17206-17212.
- Charron, F., E. Stein, J. Jeong, A.P. McMahon und M. Tessier-Lavigne. 2003. The morphogen sonic hedgehog is an axonal chemoattractant that collaborates with netrin-1 in midline axon guidance. *Cell*. 113:11-23.
- Chen, C.Y. und R.J. Schwartz. 1997. Competition between negative acting YY1 versus positive acting serum response factor and tinman homologue Nkx-2.5 regulates cardiac alpha-actin promoter activity. *Molecular endocrinology*. 11:812-822.

- Chen, J.K., J. Taipale, M.K. Cooper und P.A. Beachy. 2002a. Inhibition of Hedgehog signaling by direct binding of cyclopamine to Smoothened. *Genes & development*. 16:2743-2748.
- Chen, J.K., J. Taipale, K.E. Young, T. Maiti und P.A. Beachy. 2002b. Small molecule modulation of Smoothened activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 99:14071-14076.
- Chen, M.H., Y.J. Li, T. Kawakami, S.M. Xu und P.T. Chuang. 2004a. Palmitoylation is required for the production of a soluble multimeric Hedgehog protein complex and long-range signaling in vertebrates. *Genes & development*. 18:641-659.
- Chen, M.H., C.W. Wilson, Y.J. Li, K.K. Law, C.S. Lu, R. Gacayan, X. Zhang, C.C. Hui und P.T. Chuang. 2009. Cilium-independent regulation of Gli protein function by Sufu in Hedgehog signaling is evolutionarily conserved. *Genes & development*. 23:1910-1928.
- Chen, W., X.R. Ren, C.D. Nelson, L.S. Barak, J.K. Chen, P.A. Beachy, F. de Sauvage und R.J. Lefkowitz. 2004b. Activity-dependent internalization of smoothened mediated by beta-arrestin 2 and GRK2. *Science*. 306:2257-2260.
- Chen, Y., S. Li, C. Tong, Y. Zhao, B. Wang, Y. Liu, J. Jia und J. Jiang. 2010. G protein-coupled receptor kinase 2 promotes high-level Hedgehog signaling by regulating the active state of Smo through kinase-dependent and kinase-independent mechanisms in *Drosophila*. *Genes & development*. 24:2054-2067.
- Chen, Y., N. Sasai, G. Ma, T. Yue, J. Jia, J. Briscoe und J. Jiang. 2011a. Sonic Hedgehog dependent phosphorylation by CK1alpha and GRK2 is required for ciliary accumulation and activation of smoothened. *PLoS biology*. 9:e1001083.
- Chen, Y. und G. Struhl. 1996. Dual roles for patched in sequestering and transducing Hedgehog. *Cell*. 87:553-563.
- Chen, Y., S. Yue, L. Xie, X.H. Pu, T. Jin und S.Y. Cheng. 2011b. Dual Phosphorylation of suppressor of fused (Sufu) by PKA and GSK3beta regulates its stability and localization in the primary cilium. *The Journal of biological chemistry*. 286:13502-13511.
- Cheung, H.O., X. Zhang, A. Ribeiro, R. Mo, S. Makino, V. Puviindran, K.K. Law, J. Briscoe und C.C. Hui. 2009. The kinesin protein Kif7 is a critical regulator of Gli transcription factors in mammalian hedgehog signaling. *Science signaling*. 2:ra29.
- Chuderland, D., A. Konson und R. Seger. 2008. Identification and characterization of a general nuclear translocation signal in signaling proteins. *Molecular cell*. 31:850-861.
- Cohen, P. und S. Frame. 2001. The renaissance of GSK3. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 2:769-776.
- Cohn, M.J. und C. Tickle. 1996. Limbs: a model for pattern formation within the vertebrate body plan. *Trends in genetics : TIG*. 12:253-257.
- Coling, D. und B. Kachar. 2001. Theory and application of fluorescence microscopy. *Current protocols in neuroscience / editorial board, Jacqueline N. Crawley ... [et al.]*. Chapter 2:Unit 2 1.
- Coni, S., L. Antonucci, D. D'Amico, L. Di Magno, P. Infante, E. De Smaele, G. Giannini, L. Di Marcotullio, I. Screpanti, A. Gulino und G. Canettieri. 2013. Gli2 acetylation at lysine 757 regulates hedgehog-dependent transcriptional output by preventing its promoter occupancy. *PLoS one*. 8:e65718.
- Cooper, A.F., K.P. Yu, M. Brueckner, L.L. Brailley, L. Johnson, J.M. McGrath und A.E. Bale. 2005. Cardiac and CNS defects in a mouse with targeted disruption of suppressor of fused. *Development*. 132:4407-4417.
- Cooper, J.A. 1987. Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *The Journal of cell biology*. 105:1473-1478.
- Corcoran, R.B. und M.P. Scott. 2006. Oxysterols stimulate Sonic hedgehog signal transduction and proliferation of medulloblastoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103:8408-8413.
- Costa, A.C. und J.J. Scott-McKean. 2013. Prospects for improving brain function in individuals with Down syndrome. *CNS drugs*. 27:679-702.

- Coumoul, X. und C.X. Deng. 2003. Roles of FGF receptors in mammalian development and congenital diseases. *Birth defects research. Part C, Embryo today : reviews*. 69:286-304.
- Couve-Privat, S., B. Bouadjar, M.F. Avril, A. Sarasin und L. Daya-Grosjean. 2002. Significantly high levels of ultraviolet-specific mutations in the smoothened gene in basal cell carcinomas from DNA repair-deficient xeroderma pigmentosum patients. *Cancer research*. 62:7186-7189.
- Creanga, A., T.D. Glenn, R.K. Mann, A.M. Saunders, W.S. Talbot und P.A. Beachy. 2012. Scube/You activity mediates release of dually lipid-modified Hedgehog signal in soluble form. *Genes & development*. 26:1312-1325.
- Currier, D.G., R.C. Polk und R.H. Reeves. 2012. A Sonic hedgehog (Shh) response deficit in trisomic cells may be a common denominator for multiple features of Down syndrome. *Progress in brain research*. 197:223-236.
- Dai, P., H. Akimaru, Y. Tanaka, T. Maekawa, M. Nakafuku und S. Ishii. 1999. Sonic Hedgehog-induced activation of the Gli1 promoter is mediated by GLI3. *The Journal of biological chemistry*. 274:8143-8152.
- Dawid, I.B., J.J. Breen und R. Toyama. 1998. LIM domains: multiple roles as adapters and functional modifiers in protein interactions. *Trends in genetics : TIG*. 14:156-162.
- Demarco, R.S. und E.A. Lundquist. 2010. RACK-1 acts with Rac GTPase signaling and UNC-115/abLIM in *Caenorhabditis elegans* axon pathfinding and cell migration. *PLoS genetics*. 6:e1001215.
- Deng, X., D.Z. Ewton und E. Friedman. 2009. Mirk/Dyrk1B maintains the viability of quiescent pancreatic cancer cells by reducing levels of reactive oxygen species. *Cancer research*. 69:3317-3324.
- Deng, X., D.Z. Ewton, S.E. Mercer und E. Friedman. 2005. Mirk/dyrk1B decreases the nuclear accumulation of class II histone deacetylases during skeletal muscle differentiation. *The Journal of biological chemistry*. 280:4894-4905.
- Deng, X., S.E. Mercer, S. Shah, D.Z. Ewton und E. Friedman. 2004. The cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 is stabilized in G(0) by Mirk/dyrk1B kinase. *The Journal of biological chemistry*. 279:22498-22504.
- Dennler, S., J. Andre, I. Alexaki, A. Li, T. Magnaldo, P. ten Dijke, X.J. Wang, F. Verrecchia und A. Mauviel. 2007. Induction of sonic hedgehog mediators by transforming growth factor-beta: Smad3-dependent activation of Gli2 and Gli1 expression in vitro and in vivo. *Cancer research*. 67:6981-6986.
- Desmouliere, A., I.A. Darby und G. Gabbiani. 2003. Normal and pathologic soft tissue remodeling: role of the myofibroblast, with special emphasis on liver and kidney fibrosis. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 83:1689-1707.
- Desmouliere, A., A. Geinoz, F. Gabbiani und G. Gabbiani. 1993. Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *The Journal of cell biology*. 122:103-111.
- Di Marcotullio, L., E. Ferretti, A. Greco, E. De Smaele, A. Po, M.A. Sico, M. Alimandi, G. Giannini, M. Maroder, I. Screpanti und A. Gulino. 2006. Numb is a suppressor of Hedgehog signalling and targets Gli1 for Itch-dependent ubiquitination. *Nature cell biology*. 8:1415-1423.
- Dierks, C., J. Grbic, K. Zirlik, R. Beigi, N.P. Englund, G.R. Guo, H. Veelken, M. Engelhardt, R. Mertelsmann, J.F. Kelleher, P. Schultz und M. Warmuth. 2007. Essential role of stromally induced hedgehog signaling in B-cell malignancies. *Nature medicine*. 13:944-951.
- Dlugosz, A., S. Agrawal und P. Kirkpatrick. 2012. Vismodegib. *Nature reviews. Drug discovery*. 11:437-438.
- Dorn, K.V., C.E. Hughes und R. Rohatgi. 2012. A Smoothened-Evc2 complex transduces the Hedgehog signal at primary cilia. *Developmental cell*. 23:823-835.
- Dowjat, K., T. Adayev, W. Kaczmarek, J. Wegiel und Y.W. Hwang. 2012. Gene dosage-dependent association of DYRK1A with the cytoskeleton in the brain and lymphocytes of down

- syndrome patients. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 71:1100-1112.
- Duman-Scheel, M., L. Weng, S. Xin und W. Du. 2002. Hedgehog regulates cell growth and proliferation by inducing Cyclin D and Cyclin E. *Nature*. 417:299-304.
- Dussurget, O. und D. Roulland-Dussoix. 1994. Rapid, sensitive PCR-based detection of mycoplasmas in simulated samples of animal sera. *Applied and environmental microbiology*. 60:953-959.
- Dwyer, J.R., N. Sever, M. Carlson, S.F. Nelson, P.A. Beachy und F. Parhami. 2007. Oxysterols are novel activators of the hedgehog signaling pathway in pluripotent mesenchymal cells. *The Journal of biological chemistry*. 282:8959-8968.
- Echelard, Y., D.J. Epstein, B. St-Jacques, L. Shen, J. Mohler, J.A. McMahon und A.P. McMahon. 1993. Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell*. 75:1417-1430.
- Eichberger, T., V. Sander, H. Schnidar, G. Regl, M. Kasper, C. Schmid, S. Plamberger, A. Kaser, F. Aberger und A.M. Frischauf. 2006. Overlapping and distinct transcriptional regulator properties of the GLI1 and GLI2 oncogenes. *Genomics*. 87:616-632.
- Elberg, G., L. Chen, D. Elberg, M.D. Chan, C.J. Logan und M.A. Turman. 2008. MKL1 mediates TGF-beta1-induced alpha-smooth muscle actin expression in human renal epithelial cells. *American journal of physiology. Renal physiology*. 294:F1116-1128.
- Elion, E.A. 2006. Detection of protein-protein interactions by coprecipitation. *Current protocols in molecular biology / edited by Frederick M. Ausubel ... [et al.]*. Chapter 20:Unit20 25.
- Ellis, P.D., K.M. Martin, C. Rickman, J.C. Metcalfe und P.R. Kemp. 2002. Increased actin polymerization reduces the inhibition of serum response factor activity by Yin Yang 1. *The Biochemical journal*. 364:547-554.
- Emmenegger, B.A., E.I. Hwang, C. Moore, S.L. Markant, S.N. Brun, J.W. Dutton, T.A. Read, M.P. Fogarty, A.R. Singh, D.L. Durden, C. Yang, W.L. McKeenan und R.J. Wechsler-Reya. 2013. Distinct roles for fibroblast growth factor signaling in cerebellar development and medulloblastoma. *Oncogene*. 32:4181-4188.
- Endoh-Yamagami, S., M. Evangelista, D. Wilson, X. Wen, J.W. Theunissen, K. Phamluong, M. Davis, S.J. Scales, M.J. Solloway, F.J. de Sauvage und A.S. Peterson. 2009. The mammalian Cos2 homolog Kif7 plays an essential role in modulating Hh signal transduction during development. *Current biology : CB*. 19:1320-1326.
- Eugster, C., D. Panakova, A. Mahmoud und S. Eaton. 2007. Lipoprotein-heparan sulfate interactions in the Hh pathway. *Developmental cell*. 13:57-71.
- Feldmann, G., S. Dhara, V. Fendrich, D. Bedja, R. Beaty, M. Mullendore, C. Karikari, H. Alvarez, C. Iacobuzio-Donahue, A. Jimeno, K.L. Gabrielson, W. Matsui und A. Maitra. 2007. Blockade of hedgehog signaling inhibits pancreatic cancer invasion and metastases: a new paradigm for combination therapy in solid cancers. *Cancer research*. 67:2187-2196.
- Ferron, S.R., N. Pozo, A. Laguna, S. Aranda, E. Porlan, M. Moreno, C. Fillat, S. de la Luna, P. Sanchez, M.L. Arbones und I. Farinas. 2010. Regulated segregation of kinase Dyrk1A during asymmetric neural stem cell division is critical for EGFR-mediated biased signaling. *Cell stem cell*. 7:367-379.
- Fields, T.A. und P.J. Casey. 1997. Signalling functions and biochemical properties of pertussis toxin-resistant G-proteins. *The Biochemical journal*. 321 (Pt 3):561-571.
- Fogarty, M.P., B.A. Emmenegger, L.L. Grasmeyer, T.G. Oliver und R.J. Wechsler-Reya. 2007. Fibroblast growth factor blocks Sonic hedgehog signaling in neuronal precursors and tumor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104:2973-2978.
- Friedman, E. 2007. Mirk/Dyrk1B in cancer. *Journal of cellular biochemistry*. 102:274-279.
- Gallet, A., L. Ruel, L. Staccini-Lavenant und P.P. Therond. 2006. Cholesterol modification is necessary for controlled planar long-range activity of Hedgehog in Drosophila epithelia. *Development*. 133:407-418.

- Gao, J., Z. Zheng, B. Rawal, M.J. Schell, G. Bepler und E.B. Haura. 2009. Mirk/Dyrk1B, a novel therapeutic target, mediates cell survival in non-small cell lung cancer cells. *Cancer biology & therapy*. 8:1671-1679.
- Garrett, S. und J. Broach. 1989. Loss of Ras activity in *Saccharomyces cerevisiae* is suppressed by disruptions of a new kinase gene, YAK1, whose product may act downstream of the cAMP-dependent protein kinase. *Genes & development*. 3:1336-1348.
- Gockler, N., G. Jofre, C. Papadopoulos, U. Soppa, F.J. Tejedor und W. Becker. 2009. Harmine specifically inhibits protein kinase DYRK1A and interferes with neurite formation. *The FEBS journal*. 276:6324-6337.
- Goetz, S.C. und K.V. Anderson. 2010. The primary cilium: a signalling centre during vertebrate development. *Nature reviews. Genetics*. 11:331-344.
- Goodrich, L.V., L. Milenkovic, K.M. Higgins und M.P. Scott. 1997. Altered neural cell fates and medulloblastoma in mouse patched mutants. *Science*. 277:1109-1113.
- Gorlin, R.J. 1987. Nevoid basal-cell carcinoma syndrome. *Medicine*. 66:98-113.
- Gospodarowicz, D. 1974. Localisation of a fibroblast growth factor and its effect alone and with hydrocortisone on 3T3 cell growth. *Nature*. 249:123-127.
- Grutz, G., A. Forster und T.H. Rabbitts. 1998. Identification of the LMO4 gene encoding an interaction partner of the LIM-binding protein LDB1/NLI1: a candidate for displacement by LMO proteins in T cell acute leukaemia. *Oncogene*. 17:2799-2803.
- Guimera, J., C. Casas, C. Pucharcos, A. Solans, A. Domenech, A.M. Planas, J. Ashley, M. Lovett, X. Estivill und M.A. Pritchard. 1996. A human homologue of *Drosophila* minibrain (MNB) is expressed in the neuronal regions affected in Down syndrome and maps to the critical region. *Human molecular genetics*. 5:1305-1310.
- Guo, X., J.G. Williams, T.T. Schug und X. Li. 2010. DYRK1A and DYRK3 promote cell survival through phosphorylation and activation of SIRT1. *The Journal of biological chemistry*. 285:13223-13232.
- Gwack, Y., S. Sharma, J. Nardone, B. Tanasa, A. Iuga, S. Srikanth, H. Okamura, D. Bolton, S. Feske, P.G. Hogan und A. Rao. 2006. A genome-wide *Drosophila* RNAi screen identifies DYRK-family kinases as regulators of NFAT. *Nature*. 441:646-650.
- Hahn, H., J. Christiansen, C. Wicking, P.G. Zaphiropoulos, A. Chidambaram, B. Gerrard, I. Vorechovsky, A.E. Bale, R. Toftgard, M. Dean und B. Wainwright. 1996a. A mammalian patched homolog is expressed in target tissues of sonic hedgehog and maps to a region associated with developmental abnormalities. *The Journal of biological chemistry*. 271:12125-12128.
- Hahn, H., C. Wicking, P.G. Zaphiropoulos, M.R. Gailani, S. Shanley, A. Chidambaram, I. Vorechovsky, E. Holmberg, A.B. Unden, S. Gillies, K. Negus, I. Smyth, C. Pressman, D.J. Leffell, B. Gerrard, A.M. Goldstein, M. Dean, R. Toftgard, G. Chenevix-Trench, B. Wainwright und A.E. Bale. 1996b. Mutations of the human homolog of *Drosophila* patched in the nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Cell*. 85:841-851.
- Hammerle, B., A. Carnicero, C. Elizalde, J. Ceron, S. Martinez und F.J. Tejedor. 2003a. Expression patterns and subcellular localization of the Down syndrome candidate protein MNB/DYRK1A suggest a role in late neuronal differentiation. *The European journal of neuroscience*. 17:2277-2286.
- Hammerle, B., C. Elizalde, J. Galceran, W. Becker und F.J. Tejedor. 2003b. The MNB/DYRK1A protein kinase: neurobiological functions and Down syndrome implications. *Journal of neural transmission. Supplementum*:129-137.
- Hammerschmidt, M., A. Brook und A.P. McMahon. 1997. The world according to hedgehog. *Trends in genetics : TIG*. 13:14-21.
- Han, L., Y. Pan und B. Wang. 2012. Small ubiquitin-like Modifier (SUMO) modification inhibits GLI2 protein transcriptional activity in vitro and in vivo. *The Journal of biological chemistry*. 287:20483-20489.

- Han, Z., X. Li, J. Wu und E.N. Olson. 2004. A myocardin-related transcription factor regulates activity of serum response factor in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101:12567-12572.
- Hao, J., H. Ju, S. Zhao, A. Junaid, T. Scammell-La Fleur und I.M. Dixon. 1999. Elevation of expression of Smads 2, 3, and 4, decorin and TGF-beta in the chronic phase of myocardial infarct scar healing. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 31:667-678.
- Hatley, M.E., W. Tang, M.R. Garcia, D. Finkelstein, D.P. Millay, N. Liu, J. Graff, R.L. Galindo und E.N. Olson. 2012. A mouse model of rhabdomyosarcoma originating from the adipocyte lineage. *Cancer cell*. 22:536-546.
- Hegde, G.V., K.J. Peterson, K. Emanuel, A.K. Mittal, A.D. Joshi, J.D. Dickinson, G.J. Kollessery, R.G. Bociek, P. Bierman, J.M. Vose, D.D. Weisenburger und S.S. Joshi. 2008. Hedgehog-induced survival of B-cell chronic lymphocytic leukemia cells in a stromal cell microenvironment: a potential new therapeutic target. *Molecular cancer research : MCR*. 6:1928-1936.
- Hildebrandt, F. und E. Otto. 2005. Cilia and centrosomes: a unifying pathogenic concept for cystic kidney disease? *Nature reviews. Genetics*. 6:928-940.
- Hillman, R.T., B.Y. Feng, J. Ni, W.M. Woo, L. Milenkovic, M.G. Hayden Gephart, M.N. Teruel, A.E. Oro, J.K. Chen und M.P. Scott. 2011. Neuropilins are positive regulators of Hedgehog signal transduction. *Genes & development*. 25:2333-2346.
- Himpel, S., W. Tegge, R. Frank, S. Leder, H.G. Joost und W. Becker. 2000. Specificity determinants of substrate recognition by the protein kinase DYRK1A. *The Journal of biological chemistry*. 275:2431-2438.
- Hinson, J.S., M.D. Medlin, K. Lockman, J.M. Taylor und C.P. Mack. 2007. Smooth muscle cell-specific transcription is regulated by nuclear localization of the myocardin-related transcription factors. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*. 292:H1170-1180.
- Hinson, J.S., M.D. Medlin, J.M. Taylor und C.P. Mack. 2008. Regulation of myocardin factor protein stability by the LIM-only protein FHL2. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*. 295:H1067-H1075.
- Hofmann, K. 2000. A superfamily of membrane-bound O-acyltransferases with implications for wnt signaling. *Trends in biochemical sciences*. 25:111-112.
- Hooper, J.E. und M.P. Scott. 2005. Communicating with Hedgehogs. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 6:306-317.
- Hui, C.C. und S. Angers. 2011. Gli proteins in development and disease. *Annual review of cell and developmental biology*. 27:513-537.
- Hui, C.C., D. Slusarski, K.A. Platt, R. Holmgren und A.L. Joyner. 1994. Expression of three mouse homologs of the *Drosophila* segment polarity gene *cubitus interruptus*, Gli, Gli-2, and Gli-3, in ectoderm- and mesoderm-derived tissues suggests multiple roles during postimplantation development. *Developmental biology*. 162:402-413.
- Humke, E.W., K.V. Dorn, L. Milenkovic, M.P. Scott und R. Rohatgi. 2010. The output of Hedgehog signaling is controlled by the dynamic association between Suppressor of Fused and the Gli proteins. *Genes & development*. 24:670-682.
- Huntzicker, E.G., I.S. Estay, H. Zhen, L.A. Lokteva, P.K. Jackson und A.E. Oro. 2006. Dual degradation signals control Gli protein stability and tumor formation. *Genes & development*. 20:276-281.
- Ignatius, M.S., E. Chen, N.M. Elpek, A.Z. Fuller, I.M. Tenente, R. Clagg, S. Liu, J.S. Blackburn, C.M. Linardic, A.E. Rosenberg, P.G. Nielsen, T.R. Mempel und D.M. Langenau. 2012. In vivo imaging of tumor-propagating cells, regional tumor heterogeneity, and dynamic cell movements in embryonal rhabdomyosarcoma. *Cancer cell*. 21:680-693.
- Ingham, P.W. und A.P. McMahon. 2001. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes & development*. 15:3059-3087.
- Ingham, P.W., Y. Nakano und C. Seger. 2011. Mechanisms and functions of Hedgehog signalling across the metazoa. *Nature reviews. Genetics*. 12:393-406.

- Ingram, W.J., C.A. Wicking, S.M. Grimmond, A.R. Forrest und B.J. Wainwright. 2002. Novel genes regulated by Sonic Hedgehog in pluripotent mesenchymal cells. *Oncogene*. 21:8196-8205.
- Iwasaki, K., K. Hayashi, T. Fujioka und K. Sobue. 2008. Rho/Rho-associated kinase signal regulates myogenic differentiation via myocardin-related transcription factor-A/Smad-dependent transcription of the Id3 gene. *The Journal of biological chemistry*. 283:21230-21241.
- Izzi, L., M. Levesque, S. Morin, D. Laniel, B.C. Wilkes, F. Mille, R.S. Krauss, A.P. McMahon, B.L. Allen und F. Charron. 2011. Boc and Gas1 each form distinct Shh receptor complexes with Ptch1 and are required for Shh-mediated cell proliferation. *Developmental cell*. 20:788-801.
- Janumyan, Y., Q. Cui, L. Yan, C.G. Sansam, M. Valentin und E. Yang. 2008. G0 function of BCL2 and BCL-xL requires BAX, BAK, and p27 phosphorylation by Mirk, revealing a novel role of BAX and BAK in quiescence regulation. *The Journal of biological chemistry*. 283:34108-34120.
- Jessell, T.M. 2000. Neuronal specification in the spinal cord: inductive signals and transcriptional codes. *Nature reviews. Genetics*. 1:20-29.
- Jia, H., Y. Liu, R. Xia, C. Tong, T. Yue, J. Jiang und J. Jia. 2010. Casein kinase 2 promotes Hedgehog signaling by regulating both smoothened and Cubitus interruptus. *The Journal of biological chemistry*. 285:37218-37226.
- Jia, H., Y. Liu, W. Yan und J. Jia. 2009. PP4 and PP2A regulate Hedgehog signaling by controlling Smo and Ci phosphorylation. *Development*. 136:307-316.
- Jia, J., C. Tong, B. Wang, L. Luo und J. Jiang. 2004. Hedgehog signalling activity of Smoothened requires phosphorylation by protein kinase A and casein kinase I. *Nature*. 432:1045-1050.
- Jiang, J. 2006. Regulation of Hh/Gli signaling by dual ubiquitin pathways. *Cell cycle*. 5:2457-2463.
- Jiang, J. und C.C. Hui. 2008. Hedgehog signaling in development and cancer. *Developmental cell*. 15:801-812.
- John, M., A. Geick, P. Hadwiger, H.P. Vornlocher und O. Heidenreich. 2003. Gene silencing by RNAi in mammalian cells. *Current protocols in molecular biology / edited by Frederick M. Ausubel ... [et al.]*. Chapter 26:Unit 26 22.
- Johnson, R.L., A.L. Rothman, J. Xie, L.V. Goodrich, J.W. Bare, J.M. Bonifas, A.G. Quinn, R.M. Myers, D.R. Cox, E.H. Epstein, Jr. und M.P. Scott. 1996. Human homolog of patched, a candidate gene for the basal cell nevus syndrome. *Science*. 272:1668-1671.
- Johnson, R.L., L. Zhou und E.C. Bailey. 2002. Distinct consequences of sterol sensor mutations in Drosophila and mouse patched homologs. *Developmental biology*. 242:224-235.
- Jones, S., X. Zhang, D.W. Parsons, J.C. Lin, R.J. Leary, P. Angenendt, P. Mankoo, H. Carter, H. Kamiyama, A. Jimeno, S.M. Hong, B. Fu, M.T. Lin, E.S. Calhoun, M. Kamiyama, K. Walter, T. Nikolskaya, Y. Nikolsky, J. Hartigan, D.R. Smith, M. Hidalgo, S.D. Leach, A.P. Klein, E.M. Jaffee, M. Goggins, A. Maitra, C. Iacobuzio-Donahue, J.R. Eshleman, S.E. Kern, R.H. Hruban, R. Karchin, N. Papadopoulos, G. Parmigiani, B. Vogelstein, V.E. Velculescu und K.W. Kinzler. 2008. Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science*. 321:1801-1806.
- Jung, H.Y., X. Wang, S. Jun und J.I. Park. 2013. Dyrk2-associated EDD-DDB1-VprBP E3 ligase inhibits telomerase by TERT degradation. *The Journal of biological chemistry*. 288:7252-7262.
- Kalita, K., G. Kharebava, J.J. Zheng und M. Hetman. 2006. Role of megakaryoblastic acute leukemia-1 in ERK1/2-dependent stimulation of serum response factor-driven transcription by BDNF or increased synaptic activity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 26:10020-10032.
- Kalita, K., B. Kuzniewska und L. Kaczmarek. 2012. MKLs: co-factors of serum response factor (SRF) in neuronal responses. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 44:1444-1447.

- Kang, J.E., S.A. Choi, J.B. Park und K.C. Chung. 2005. Regulation of the proapoptotic activity of huntingtin interacting protein 1 by Dyrk1 and caspase-3 in hippocampal neuroprogenitor cells. *Journal of neuroscience research*. 81:62-72.
- Kannan, N. und A.F. Neuwald. 2004. Evolutionary constraints associated with functional specificity of the CMGC protein kinases MAPK, CDK, GSK, SRPK, DYRK, and CK2alpha. *Protein science : a publication of the Protein Society*. 13:2059-2077.
- Kassis, S., T. Melhuish, R.S. Annan, S.L. Chen, J.C. Lee, G.P. Livi und C.L. Creasy. 2000. Saccharomyces cerevisiae Yak1p protein kinase autophosphorylates on tyrosine residues and phosphorylates myelin basic protein on a C-terminal serine residue. *The Biochemical journal*. 348 Pt 2:263-272.
- Katoh, Y. und M. Katoh. 2008. Integrative genomic analyses on GLI2: mechanism of Hedgehog priming through basal GLI2 expression, and interaction map of stem cell signaling network with P53. *International journal of oncology*. 33:881-886.
- Kelly, P.A. und Z. Rahmani. 2005. DYRK1A enhances the mitogen-activated protein kinase cascade in PC12 cells by forming a complex with Ras, B-Raf, and MEK1. *Molecular biology of the cell*. 16:3562-3573.
- Kentrup, H., W. Becker, J. Heukelbach, A. Wilmes, A. Schurmann, C. Huppertz, H. Kainulainen und H.G. Joost. 1996. Dyrk, a dual specificity protein kinase with unique structural features whose activity is dependent on tyrosine residues between subdomains VII and VIII. *The Journal of biological chemistry*. 271:3488-3495.
- Kessaris, N., F. Jamen, L.L. Rubin und W.D. Richardson. 2004. Cooperation between sonic hedgehog and fibroblast growth factor/MAPK signalling pathways in neocortical precursors. *Development*. 131:1289-1298.
- Khaliullina, H., D. Panakova, C. Eugster, F. Riedel, M. Carvalho und S. Eaton. 2009. Patched regulates Smoothed trafficking using lipoprotein-derived lipids. *Development*. 136:4111-4121.
- Kim, A.C., L.L. Peters, J.H. Knoll, C. Van Huffel, S.L. Ciciotte, P.W. Kleyn und A.H. Chishti. 1997. Limatin (LIMAB1), an actin-binding LIM protein, maps to mouse chromosome 19 and human chromosome 10q25, a region frequently deleted in human cancers. *Genomics*. 46:291-293.
- Kim, D., J. Won, D.W. Shin, J. Kang, Y.J. Kim, S.Y. Choi, M.K. Hwang, B.W. Jeong, G.S. Kim, C.O. Joe, S.H. Chung und W.J. Song. 2004. Regulation of Dyrk1A kinase activity by 14-3-3. *Biochemical and biophysical research communications*. 323:499-504.
- Kim, J., M. Kato und P.A. Beachy. 2009. Gli2 trafficking links Hedgehog-dependent activation of Smoothed in the primary cilium to transcriptional activation in the nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 106:21666-21671.
- Kim, J.Y., J. Yoon, B.S. Yoo, S.H. Lee und K.H. Choe. 2007. The effect of a eutectic mixture of local anesthetic cream on wrist pain during transradial coronary procedures. *The Journal of invasive cardiology*. 19:6-9.
- Kinstrie, R., N. Luebbering, D. Miranda-Saavedra, G. Sibbet, J. Han, P.A. Lochhead und V. Cleghon. 2010. Characterization of a domain that transiently converts class 2 DYRKs into intramolecular tyrosine kinases. *Science signaling*. 3:ra16.
- Kinzler, K.W. und B. Vogelstein. 1990. The GLI gene encodes a nuclear protein which binds specific sequences in the human genome. *Molecular and cellular biology*. 10:634-642.
- Kise, Y., A. Morinaka, S. Teglund und H. Miki. 2009. Sufu recruits GSK3beta for efficient processing of Gli3. *Biochemical and biophysical research communications*. 387:569-574.
- Kita-Matsuo, H., M. Barcova, N. Prigozhina, N. Salomonis, K. Wei, J.G. Jacot, B. Nelson, S. Spiering, R. Haverslag, C. Kim, M. Talantova, R. Bajpai, D. Calzolari, A. Tersikh, A.D. McCulloch, J.H. Price, B.R. Conklin, H.S. Chen und M. Mercola. 2009. Lentiviral vectors and protocols for creation of stable hESC lines for fluorescent tracking and drug resistance selection of cardiomyocytes. *PloS one*. 4:e5046.

- Klimov, E., O. Rud'ko, E. Rakhmanaliev und G. Sulimova. 2005. Genomic organisation and tissue specific expression of ABLIM2 gene in human, mouse and rat. *Biochimica et biophysica acta*. 1730:1-9.
- Kobayashi, T. und B.D. Dynlacht. 2011. Regulating the transition from centriole to basal body. *The Journal of cell biology*. 193:435-444.
- Kogerman, P., T. Grimm, L. Kogerman, D. Krause, A.B. Uden, B. Sandstedt, R. Toftgard und P.G. Zaphiropoulos. 1999. Mammalian suppressor-of-fused modulates nuclear-cytoplasmic shuttling of Gli-1. *Nature cell biology*. 1:312-319.
- Kottakis, F., C. Polytarchou, P. Foltopoulou, I. Sanidas, S.C. Kampranis und P.N. Tsiachlis. 2011. FGF-2 regulates cell proliferation, migration, and angiogenesis through an NDY1/KDM2B-miR-101-EZH2 pathway. *Molecular cell*. 43:285-298.
- Kovacs, J.J., E.J. Whalen, R. Liu, K. Xiao, J. Kim, M. Chen, J. Wang, W. Chen und R.J. Lefkowitz. 2008. Beta-arrestin-mediated localization of smoothened to the primary cilium. *Science*. 320:1777-1781.
- Koziel, L., M. Kunath, O.G. Kelly und A. Vortkamp. 2004. Ext1-dependent heparan sulfate regulates the range of Ihh signaling during endochondral ossification. *Developmental cell*. 6:801-813.
- Kristiansen, K. 2004. Molecular mechanisms of ligand binding, signaling, and regulation within the superfamily of G-protein-coupled receptors: molecular modeling and mutagenesis approaches to receptor structure and function. *Pharmacology & therapeutics*. 103:21-80.
- Krupp, M., A. Weinmann, P.R. Galle und A. Teufel. 2006. Actin binding LIM protein 3 (abLIM3). *International journal of molecular medicine*. 17:129-133.
- Kuhn, C., D. Frank, R. Will, C. Jaschinski, R. Frauen, H.A. Katus und N. Frey. 2009. DYRK1A is a novel negative regulator of cardiomyocyte hypertrophy. *The Journal of biological chemistry*. 284:17320-17327.
- Kuwabara, P.E. und M. Labouesse. 2002. The sterol-sensing domain: multiple families, a unique role? *Trends in genetics : TIG*. 18:193-201.
- Kuwahara, K., T. Barrientos, G.C. Pipes, S. Li und E.N. Olson. 2005. Muscle-specific signaling mechanism that links actin dynamics to serum response factor. *Molecular and cellular biology*. 25:3173-3181.
- Kuwahara, K., H. Kinoshita, Y. Kuwabara, Y. Nakagawa, S. Usami, T. Minami, Y. Yamada, M. Fujiwara und K. Nakao. 2010. Myocardin-related transcription factor A is a common mediator of mechanical stress- and neurohumoral stimulation-induced cardiac hypertrophic signaling leading to activation of brain natriuretic peptide gene expression. *Molecular and cellular biology*. 30:4134-4148.
- Kuwahara, K., G.C. Teg Pipes, J. McAnally, J.A. Richardson, J.A. Hill, R. Bassel-Duby und E.N. Olson. 2007. Modulation of adverse cardiac remodeling by STARS, a mediator of MEF2 signaling and SRF activity. *The Journal of clinical investigation*. 117:1324-1334.
- Laguna, A., S. Aranda, M.J. Barallobre, R. Barhoum, E. Fernandez, V. Fotaki, J.M. Delabar, S. de la Luna, P. de la Villa und M.L. Arbones. 2008. The protein kinase DYRK1A regulates caspase-9-mediated apoptosis during retina development. *Developmental cell*. 15:841-853.
- Lam, C.W., J. Xie, K.F. To, H.K. Ng, K.C. Lee, N.W. Yuen, P.L. Lim, L.Y. Chan, S.F. Tong und F. McCormick. 1999. A frequent activated smoothened mutation in sporadic basal cell carcinomas. *Oncogene*. 18:833-836.
- Lauth, M., A. Bergstrom, T. Shimokawa, U. Tostar, Q. Jin, V. Fendrich, C. Guerra, M. Barbacid und R. Toftgard. 2010. DYRK1B-dependent autocrine-to-paracrine shift of Hedgehog signaling by mutant RAS. *Nature structural & molecular biology*. 17:718-725.
- Lauth, M. und R. Toftgard. 2007. Non-canonical activation of GLI transcription factors: implications for targeted anti-cancer therapy. *Cell cycle*. 6:2458-2463.
- Lee, J., K.A. Platt, P. Censullo und A. Ruiz i Altaba. 1997. Gli1 is a target of Sonic hedgehog that induces ventral neural tube development. *Development*. 124:2537-2552.

- Lee, J. und T. Tumber. 2012. Hairy tale of signaling in hair follicle development and cycling. *Seminars in cell & developmental biology*. 23:906-916.
- Lee, J.D. und J.E. Treisman. 2001. Sightless has homology to transmembrane acyltransferases and is required to generate active Hedgehog protein. *Current biology : CB*. 11:1147-1152.
- Lee, K., X. Deng und E. Friedman. 2000. Mirk protein kinase is a mitogen-activated protein kinase substrate that mediates survival of colon cancer cells. *Cancer research*. 60:3631-3637.
- Lee, P.L., D.E. Johnson, L.S. Cousens, V.A. Fried und L.T. Williams. 1989. Purification and complementary DNA cloning of a receptor for basic fibroblast growth factor. *Science*. 245:57-60.
- Lee, S.M., M. Vasishta und R. Prywes. 2010. Activation and repression of cellular immediate early genes by serum response factor cofactors. *The Journal of biological chemistry*. 285:22036-22049.
- Lee, Y., J. Ha, H.J. Kim, Y.S. Kim, E.J. Chang, W.J. Song und H.H. Kim. 2009. Negative feedback Inhibition of NFATc1 by DYRK1A regulates bone homeostasis. *The Journal of biological chemistry*. 284:33343-33351.
- Lepagnol-Bestel, A.M., A. Zvara, G. Maussion, F. Quignon, B. Ngimbous, N. Ramoz, S. Imbeaud, Y. Loe-Mie, K. Benihoud, N. Agier, P.A. Salin, A. Cardona, S. Khung-Savatovsky, P. Kallunki, J.M. Delabar, L.G. Puskas, H. Delacroix, L. Aggerbeck, A.L. Delezoide, O. Delattre, P. Gorwood, J.M. Moalic und M. Simonneau. 2009. DYRK1A interacts with the REST/NRSF-SWI/SNF chromatin remodelling complex to deregulate gene clusters involved in the neuronal phenotypic traits of Down syndrome. *Human molecular genetics*. 18:1405-1414.
- Levin, M., R.L. Johnson, C.D. Stern, M. Kuehn und C. Tabin. 1995. A molecular pathway determining left-right asymmetry in chick embryogenesis. *Cell*. 82:803-814.
- Li, D., R.A. Jackson, P. Yusoff und G.R. Guy. 2010. Direct association of Sprouty-related protein with an EVH1 domain (SPRED) 1 or SPRED2 with DYRK1A modifies substrate/kinase interactions. *The Journal of biological chemistry*. 285:35374-35385.
- Li, F., W. Shi, M. Capurro und J. Filmus. 2011. Glypican-5 stimulates rhabdomyosarcoma cell proliferation by activating Hedgehog signaling. *The Journal of cell biology*. 192:691-704.
- Li, J., X. Zhu, M. Chen, L. Cheng, D. Zhou, M.M. Lu, K. Du, J.A. Epstein und M.S. Parmacek. 2005. Myocardin-related transcription factor B is required in cardiac neural crest for smooth muscle differentiation and cardiovascular development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102:8916-8921.
- Li, K., S. Zhao, V. Karur und D.M. Wojchowski. 2002. DYRK3 activation, engagement of protein kinase A/cAMP response element-binding protein, and modulation of progenitor cell survival. *The Journal of biological chemistry*. 277:47052-47060.
- Li, S., S. Chang, X. Qi, J.A. Richardson und E.N. Olson. 2006. Requirement of a myocardin-related transcription factor for development of mammary myoepithelial cells. *Molecular and cellular biology*. 26:5797-5808.
- Liem, K.F., Jr., M. He, P.J. Ocbina und K.V. Anderson. 2009. Mouse Kif7/Costal2 is a cilia-associated protein that regulates Sonic hedgehog signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 106:13377-13382.
- Lim, S., K. Jin und E. Friedman. 2002. Mirk protein kinase is activated by MKK3 and functions as a transcriptional activator of HNF1alpha. *The Journal of biological chemistry*. 277:25040-25046.
- Litingtung, Y. und C. Chiang. 2000. Specification of ventral neuron types is mediated by an antagonistic interaction between Shh and Gli3. *Nature neuroscience*. 3:979-985.
- Liu, A., B. Wang und L.A. Niswander. 2005a. Mouse intraflagellar transport proteins regulate both the activator and repressor functions of Gli transcription factors. *Development*. 132:3103-3111.
- Liu, H.W., A.J. Halayko, D.J. Fernandes, G.S. Harmon, J.A. McCauley, P. Kocieniewski, J. McConville, Y. Fu, S.M. Forsythe, P. Kogut, S. Bellam, M. Dowell, J. Churchill, H. Lesso, K.

- Kassiri, R.W. Mitchell, M.B. Hershenson, B. Camoretti-Mercado und J. Solway. 2003. The RhoA/Rho kinase pathway regulates nuclear localization of serum response factor. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 29:39-47.
- Liu, T., D. Sims und B. Baum. 2009. Parallel RNAi screens across different cell lines identify generic and cell type-specific regulators of actin organization and cell morphology. *Genome biology*. 10:R26.
- Liu, Z.P., Z. Wang, H. Yanagisawa und E.N. Olson. 2005b. Phenotypic modulation of smooth muscle cells through interaction of Foxo4 and myocardin. *Developmental cell*. 9:261-270.
- Lochhead, P.A., G. Sibbet, N. Morrice und V. Cleghon. 2005. Activation-loop autophosphorylation is mediated by a novel transitional intermediate form of DYRKs. *Cell*. 121:925-936.
- Lockman, K., J.M. Taylor und C.P. Mack. 2007. The histone demethylase, Jmjd1a, interacts with the myocardin factors to regulate SMC differentiation marker gene expression. *Circulation research*. 101:e115-123.
- Lord, K.A., C.L. Creasy, A.G. King, C. King, B.M. Burns, J.C. Lee und S.B. Dillon. 2000. REDK, a novel human regulatory erythroid kinase. *Blood*. 95:2838-2846.
- Low, W.C., C. Wang, Y. Pan, X.Y. Huang, J.K. Chen und B. Wang. 2008. The decoupling of Smoothed from Galphai proteins has little effect on Gli3 protein processing and Hedgehog-regulated chick neural tube patterning. *Developmental biology*. 321:188-196.
- Lum, L. und P.A. Beachy. 2004. The Hedgehog response network: sensors, switches, and routers. *Science*. 304:1755-1759.
- Mack, C.P., A.V. Somlyo, M. Hautmann, A.P. Somlyo und G.K. Owens. 2001. Smooth muscle differentiation marker gene expression is regulated by RhoA-mediated actin polymerization. *The Journal of biological chemistry*. 276:341-347.
- Maddika, S. und J. Chen. 2009. Protein kinase DYRK2 is a scaffold that facilitates assembly of an E3 ligase. *Nature cell biology*. 11:409-419.
- Mandel, M. und A. Higa. 1970. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *Journal of molecular biology*. 53:159-162.
- Mann, R.K. und P.A. Beachy. 2004. Novel lipid modifications of secreted protein signals. *Annual review of biochemistry*. 73:891-923.
- Mao, J., P. Maye, P. Kogerman, F.J. Tejedor, R. Toftgard, W. Xie, G. Wu und D. Wu. 2002. Regulation of Gli1 transcriptional activity in the nucleus by Dyrk1. *The Journal of biological chemistry*. 277:35156-35161.
- Marinissen, M.J. und J.S. Gutkind. 2001. G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends in pharmacological sciences*. 22:368-376.
- Marti, E., X. Altafaj, M. Dierssen, S. de la Luna, V. Fotaki, M. Alvarez, M. Perez-Riba, I. Ferrer und X. Estivill. 2003. Dyrk1A expression pattern supports specific roles of this kinase in the adult central nervous system. *Brain research*. 964:250-263.
- Martin, K.A., A. Gualberto, M.F. Kolman, J. Lowry und K. Walsh. 1997. A competitive mechanism of CARG element regulation by YY1 and SRF: implications for assessment of Phox1/MHox transcription factor interactions at CARG elements. *DNA and cell biology*. 16:653-661.
- Martin, V., G. Carrillo, C. Torroja und I. Guerrero. 2001. The sterol-sensing domain of Patched protein seems to control Smoothed activity through Patched vesicular trafficking. *Current biology : CB*. 11:601-607.
- Martinez de Lagran, M., R. Benavides-Piccione, I. Ballesteros-Yanez, M. Calvo, M. Morales, C. Fillat, J. Defelipe, G.J. Ramakers und M. Dierssen. 2012. Dyrk1A influences neuronal morphogenesis through regulation of cytoskeletal dynamics in mammalian cortical neurons. *Cerebral cortex*. 22:2867-2877.
- Masszi, A., P. Speight, E. Charbonney, M. Lodyga, H. Nakano, K. Szaszi und A. Kapus. 2010. Fate-determining mechanisms in epithelial-myofibroblast transition: major inhibitory role for Smad3. *The Journal of cell biology*. 188:383-399.

- Masters, S.C. 2004. Co-immunoprecipitation from transfected cells. *Methods in molecular biology*. 261:337-350.
- Matise, M.P., D.J. Epstein, H.L. Park, K.A. Platt und A.L. Joyner. 1998. Gli2 is required for induction of floor plate and adjacent cells, but not most ventral neurons in the mouse central nervous system. *Development*. 125:2759-2770.
- Matsuda, M., J.K. Yamashita, S. Tsukita und M. Furuse. 2010. abLIM3 is a novel component of adherens junctions with actin-binding activity. *European journal of cell biology*. 89:807-816.
- Mayer, D.C. und L.A. Leinwand. 1997. Sarcomeric gene expression and contractility in myofibroblasts. *The Journal of cell biology*. 139:1477-1484.
- McGee, K.M., M.K. Vartiainen, P.T. Khaw, R. Treisman und M. Bailly. 2011. Nuclear transport of the serum response factor coactivator MRTF-A is downregulated at tensional homeostasis. *EMBO reports*. 12:963-970.
- Mercer, S.E., D.Z. Ewton, X. Deng, S. Lim, T.R. Mazur und E. Friedman. 2005. Mirk/Dyrk1B mediates survival during the differentiation of C2C12 myoblasts. *The Journal of biological chemistry*. 280:25788-25801.
- Merchant, M., F.F. Vajdos, M. Ultsch, H.R. Maun, U. Wendt, J. Cannon, W. Desmarais, R.A. Lazarus, A.M. de Vos und F.J. de Sauvage. 2004. Suppressor of fused regulates Gli activity through a dual binding mechanism. *Molecular and cellular biology*. 24:8627-8641.
- Mercher, T., M.B. Coniat, R. Monni, M. Mauchauffe, F. Nguyen Khac, L. Gressin, F. Mugneret, T. Leblanc, N. Dastugue, R. Berger und O.A. Bernard. 2001. Involvement of a human gene related to the Drosophila spen gene in the recurrent t(1;22) translocation of acute megakaryocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 98:5776-5779.
- Miano, J.M. 2003. Serum response factor: toggling between disparate programs of gene expression. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 35:577-593.
- Miano, J.M. 2010. Role of serum response factor in the pathogenesis of disease. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 90:1274-1284.
- Micchelli, C.A., I. The, E. Selva, V. Mogila und N. Perrimon. 2002. Rasp, a putative transmembrane acyltransferase, is required for Hedgehog signaling. *Development*. 129:843-851.
- Milenkovic, L., M.P. Scott und R. Rohatgi. 2009. Lateral transport of Smoothened from the plasma membrane to the membrane of the cilium. *The Journal of cell biology*. 187:365-374.
- Mille, F., C. Thibert, J. Fombonne, N. Rama, C. Guix, H. Hayashi, V. Corset, J.C. Reed und P. Mehlen. 2009. The Patched dependence receptor triggers apoptosis through a DRAL-caspase-9 complex. *Nature cell biology*. 11:739-746.
- Miralles, F., G. Posern, A.I. Zaromytidou und R. Treisman. 2003. Actin dynamics control SRF activity by regulation of its coactivator MAL. *Cell*. 113:329-342.
- Miralles, F. und N. Visa. 2006. Actin in transcription and transcription regulation. *Current opinion in cell biology*. 18:261-266.
- Mokalled, M.H., A. Johnson, Y. Kim, J. Oh und E.N. Olson. 2010. Myocardin-related transcription factors regulate the Cdk5/Pctaire1 kinase cascade to control neurite outgrowth, neuronal migration and brain development. *Development*. 137:2365-2374.
- Moller, R.S., S. Kubart, M. Hoeltzenbein, B. Heye, I. Vogel, C.P. Hansen, C. Menzel, R. Ullmann, N. Tommerup, H.H. Ropers, Z. Tumer und V.M. Kalscheuer. 2008. Truncation of the Down syndrome candidate gene DYRK1A in two unrelated patients with microcephaly. *American journal of human genetics*. 82:1165-1170.
- Molnar, C., H. Holguin, F. Mayor, Jr., A. Ruiz-Gomez und J.F. de Celis. 2007. The G protein-coupled receptor regulatory kinase GPRK2 participates in Hedgehog signaling in Drosophila. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104:7963-7968.

- Morita, K., C. Lo Celso, B. Spencer-Dene, C.C. Zouboulis und F.M. Watt. 2006. HAN11 binds mDia1 and controls GLI1 transcriptional activity. *Journal of dermatological science*. 44:11-20.
- Morita, T., T. Mayanagi und K. Sobue. 2007. Dual roles of myocardin-related transcription factors in epithelial mesenchymal transition via slug induction and actin remodeling. *The Journal of cell biology*. 179:1027-1042.
- Mouilleron, S., C.A. Langer, S. Guettler, N.Q. McDonald und R. Treisman. 2011. Structure of a pentavalent G-actin*MRTF-A complex reveals how G-actin controls nucleocytoplasmic shuttling of a transcriptional coactivator. *Science signaling*. 4:ra40.
- Muehlich, S., R. Wang, S.M. Lee, T.C. Lewis, C. Dai und R. Prywes. 2008. Serum-induced phosphorylation of the serum response factor coactivator MKL1 by the extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway inhibits its nuclear localization. *Molecular and cellular biology*. 28:6302-6313.
- Mukhopadhyay, S., X. Wen, B. Chih, C.D. Nelson, W.S. Lane, S.J. Scales und P.K. Jackson. 2010. TULP3 bridges the IFT-A complex and membrane phosphoinositides to promote trafficking of G protein-coupled receptors into primary cilia. *Genes & development*. 24:2180-2193.
- Mukhopadhyay, S., X. Wen, N. Ratti, A. Loktev, L. Rangell, S.J. Scales und P.K. Jackson. 2013. The ciliary G-protein-coupled receptor Gpr161 negatively regulates the Sonic hedgehog pathway via cAMP signaling. *Cell*. 152:210-223.
- Murakami, N., D. Bolton und Y.W. Hwang. 2009. Dyrk1A binds to multiple endocytic proteins required for formation of clathrin-coated vesicles. *Biochemistry*. 48:9297-9305.
- Murnane, J.P., M.J. Yezzi und B.R. Young. 1990. Recombination events during integration of transfected DNA into normal human cells. *Nucleic acids research*. 18:2733-2738.
- Murone, M., S.M. Luoh, D. Stone, W. Li, A. Gurney, M. Armanini, C. Grey, A. Rosenthal und F.J. de Sauvage. 2000. Gli regulation by the opposing activities of fused and suppressor of fused. *Nature cell biology*. 2:310-312.
- Nachtergaele, S., L.K. Mydock, K. Krishnan, J. Rammohan, P.H. Schlesinger, D.F. Covey und R. Rohatgi. 2012. Oxysterols are allosteric activators of the oncoprotein Smoothened. *Nature chemical biology*. 8:211-220.
- Nakagawa, K. und N. Kuzumaki. 2005. Transcriptional activity of megakaryoblastic leukemia 1 (MKL1) is repressed by SUMO modification. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*. 10:835-850.
- Nanni, L., J.E. Ming, M. Bocian, K. Steinhaus, D.W. Bianchi, C. Die-Smulders, A. Giannotti, K. Imaizumi, K.L. Jones, M.D. Campo, R.A. Martin, P. Meinecke, M.E. Pierpont, N.H. Robin, I.D. Young, E. Roessler und M. Muenke. 1999. The mutational spectrum of the sonic hedgehog gene in holoprosencephaly: SHH mutations cause a significant proportion of autosomal dominant holoprosencephaly. *Human molecular genetics*. 8:2479-2488.
- Niewiadomski, P., J.H. Kong, R. Ahrends, Y. Ma, E.W. Humke, S. Khan, M.N. Teruel, B.G. Novitch und R. Rohatgi. 2014. Gli protein activity is controlled by multisite phosphorylation in vertebrate Hedgehog signaling. *Cell reports*. 6:168-181.
- Nishi, Y. und R. Lin. 2005. DYRK2 and GSK-3 phosphorylate and promote the timely degradation of OMA-1, a key regulator of the oocyte-to-embryo transition in *C. elegans*. *Developmental biology*. 288:139-149.
- Nishi, Y., E. Rogers, S.M. Robertson und R. Lin. 2008. Polo kinases regulate *C. elegans* embryonic polarity via binding to DYRK2-primed MEX-5 and MEX-6. *Development*. 135:687-697.
- Nitzki, F., A. Zibat, A. Frommhold, A. Schneider, W. Schulz-Schaeffer, T. Braun und H. Hahn. 2011. Uncommitted precursor cells might contribute to increased incidence of embryonal rhabdomyosarcoma in heterozygous Patched1-mutant mice. *Oncogene*. 30:4428-4436.
- Nolan-Stevaux, O., J. Lau, M.L. Truitt, G.C. Chu, M. Hebrok, M.E. Fernandez-Zapico und D. Hanahan. 2009. GLI1 is regulated through Smoothened-independent mechanisms in neoplastic pancreatic ducts and mediates PDAC cell survival and transformation. *Genes & development*. 23:24-36.

- Norris, A.D., J.O. Dyer und E.A. Lundquist. 2009. The Arp2/3 complex, UNC-115/abLIM, and UNC-34/Enabled regulate axon guidance and growth cone filopodia formation in *Caenorhabditis elegans*. *Neural development*. 4:38.
- Nusslein-Volhard, C. und E. Wieschaus. 1980. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature*. 287:795-801.
- Ogden, S.K., D.L. Fei, N.S. Schilling, Y.F. Ahmed, J. Hwa und D.J. Robbins. 2008. G protein Galphai functions immediately downstream of Smoothened in Hedgehog signalling. *Nature*. 456:967-970.
- Oishi, M. und S.D. Cosloy. 1972. The genetic and biochemical basis of the transformability of *Escherichia coli* K12. *Biochemical and biophysical research communications*. 49:1568-1572.
- Olson, E.N. und A. Nordheim. 2010. Linking actin dynamics and gene transcription to drive cellular motile functions. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 11:353-365.
- Orenic, T.V., D.C. Slusarski, K.L. Kroll und R.A. Holmgren. 1990. Cloning and characterization of the segment polarity gene cubitus interruptus Dominant of *Drosophila*. *Genes & development*. 4:1053-1067.
- Oro, A.E. 2007. The primary cilia, a 'Rab-id' transit system for hedgehog signaling. *Current opinion in cell biology*. 19:691-696.
- Pan, Y., C.B. Bai, A.L. Joyner und B. Wang. 2006. Sonic hedgehog signaling regulates Gli2 transcriptional activity by suppressing its processing and degradation. *Molecular and cellular biology*. 26:3365-3377.
- Panakova, D., H. Sprong, E. Marois, C. Thiele und S. Eaton. 2005. Lipoprotein particles are required for Hedgehog and Wingless signalling. *Nature*. 435:58-65.
- Papadopoulos, C., K. Arato, E. Lilienthal, J. Zerweck, M. Schutkowski, N. Chatain, G. Muller-Newen, W. Becker und S. de la Luna. 2011. Splice variants of the dual specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 4 (DYRK4) differ in their subcellular localization and catalytic activity. *The Journal of biological chemistry*. 286:5494-5505.
- Park, J., Y. Oh, L. Yoo, M.S. Jung, W.J. Song, S.H. Lee, H. Seo und K.C. Chung. 2010. Dyrk1A phosphorylates p53 and inhibits proliferation of embryonic neuronal cells. *The Journal of biological chemistry*. 285:31895-31906.
- Park, J., W.J. Song und K.C. Chung. 2009. Function and regulation of Dyrk1A: towards understanding Down syndrome. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 66:3235-3240.
- Park, J., J.Y. Sung, J. Park, W.J. Song, S. Chang und K.C. Chung. 2012. Dyrk1A negatively regulates the actin cytoskeleton through threonine phosphorylation of N-WASP. *Journal of cell science*. 125:67-80.
- Park, K.S., L.G. Martelotto, M. Peifer, M.L. Sos, A.N. Karnezis, M.R. Mahjoub, K. Bernard, J.F. Conklin, A. Szczepny, J. Yuan, R. Guo, B. Ospina, J. Falzon, S. Bennett, T.J. Brown, A. Markovic, W.L. Devereux, C.A. Ocasio, J.K. Chen, T. Stearns, R.K. Thomas, M. Dorsch, S. Buonamici, D.N. Watkins, C.D. Peacock und J. Sage. 2011. A crucial requirement for Hedgehog signaling in small cell lung cancer. *Nature medicine*. 17:1504-1508.
- Parmacek, M.S. 2007. Myocardin-related transcription factors: critical coactivators regulating cardiovascular development and adaptation. *Circulation research*. 100:633-644.
- Parry, J.M., N.V. Velarde, A.J. Lefkovith, M.H. Zegarek, J.S. Hang, J. Ohm, R. Klancer, R. Maruyama, M.K. Druzhinina, B.D. Grant, F. Piano und A. Singson. 2009. EGG-4 and EGG-5 Link Events of the Oocyte-to-Embryo Transition with Meiotic Progression in *C. elegans*. *Current biology : CB*. 19:1752-1757.
- Pearse, R.V., 2nd, L.S. Collier, M.P. Scott und C.J. Tabin. 1999. Vertebrate homologs of *Drosophila* suppressor of fused interact with the gli family of transcriptional regulators. *Developmental biology*. 212:323-336.
- Pelczar, P., A. Zibat, W.A. van Dop, J. Heijmans, A. Bleckmann, W. Gruber, F. Nitzki, A. Uhmman, M.V. Guijarro, E. Hernando, K. Dittmann, J. Wienands, R. Dressel, L. Wojnowski, C. Binder, T. Taguchi, T. Beissbarth, P.C. Hogendoorn, C.R. Antonescu, B.P. Rubin, W.

- Schulz-Schaeffer, F. Aberger, G.R. van den Brink und H. Hahn. 2013. Inactivation of Patched1 in mice leads to development of gastrointestinal stromal-like tumors that express Pdgfralpha but not kit. *Gastroenterology*. 144:134-144 e136.
- Pelkmans, L., E. Fava, H. Grabner, M. Hannus, B. Habermann, E. Krausz und M. Zerial. 2005. Genome-wide analysis of human kinases in clathrin- and caveolae/raft-mediated endocytosis. *Nature*. 436:78-86.
- Pelkmans, L. und M. Zerial. 2005. Kinase-regulated quantal assemblies and kiss-and-run recycling of caveolae. *Nature*. 436:128-133.
- Perler, F.B. 1998. Protein splicing of inteins and hedgehog autoproteolysis: structure, function, and evolution. *Cell*. 92:1-4.
- Philipp, M., G.B. Fralish, A.R. Meloni, W. Chen, A.W. MacInnes, L.S. Barak und M.G. Caron. 2008. Smoothed signaling in vertebrates is facilitated by a G protein-coupled receptor kinase. *Molecular biology of the cell*. 19:5478-5489.
- Philippar, U., G. Schratt, C. Dieterich, J.M. Muller, P. Galgoczy, F.B. Engel, M.T. Keating, F. Gertler, R. Schule, M. Vingron und A. Nordheim. 2004. The SRF target gene Fhl2 antagonizes RhoA/MAL-dependent activation of SRF. *Molecular cell*. 16:867-880.
- Polizio, A.H., P. Chinchilla, X. Chen, D.R. Manning und N.A. Riobo. 2011. Sonic Hedgehog activates the GTPases Rac1 and RhoA in a Gli-independent manner through coupling of smoothed to Gi proteins. *Science signaling*. 4:pt7.
- Posern, G. und R. Treisman. 2006. Actin' together: serum response factor, its cofactors and the link to signal transduction. *Trends in cell biology*. 16:588-596.
- Potter, H. und R. Heller. 2011. Transfection by electroporation. *Current protocols in cell biology / editorial board, Juan S. Bonifacino ... [et al.]*. Chapter 20:Unit20 25.
- Qiu, P., R.P. Ritchie, Z. Fu, D. Cao, J. Cumming, J.M. Miano, D.Z. Wang, H.J. Li und L. Li. 2005. Myocardin enhances Smad3-mediated transforming growth factor-beta1 signaling in a CARG box-independent manner: Smad-binding element is an important cis element for SM22alpha transcription in vivo. *Circulation research*. 97:983-991.
- Raaf, L., C. Noll, M. Cherifi, Y. Benazzoug, J.M. Delabar und N. Janel. 2010. Hyperhomocysteinemia-induced Dyrk1a downregulation results in cardiomyocyte hypertrophy in rats. *International journal of cardiology*. 145:306-307.
- Raffel, C., R.B. Jenkins, L. Frederick, D. Hebrink, B. Alderete, D.W. Fults und C.D. James. 1997. Sporadic medulloblastomas contain PTCH mutations. *Cancer research*. 57:842-845.
- Rana, A.P., P. Ruff, G.J. Maalouf, D.W. Speicher und A.H. Chishti. 1993. Cloning of human erythroid dematin reveals another member of the villin family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 90:6651-6655.
- Reifenberger, J., M. Wolter, C.B. Knobbe, B. Kohler, A. Schonicke, C. Scharwachter, K. Kumar, B. Blaschke, T. Ruzicka und G. Reifenberger. 2005. Somatic mutations in the PTCH, SMOH, SUFUH and TP53 genes in sporadic basal cell carcinomas. *The British journal of dermatology*. 152:43-51.
- Reifenberger, J., M. Wolter, R.G. Weber, M. Megahed, T. Ruzicka, P. Lichter und G. Reifenberger. 1998. Missense mutations in SMOH in sporadic basal cell carcinomas of the skin and primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system. *Cancer research*. 58:1798-1803.
- Reiter, J.F. und W.C. Skarnes. 2006. Tectonic, a novel regulator of the Hedgehog pathway required for both activation and inhibition. *Genes & development*. 20:22-27.
- Riobo, N.A., G.M. Haines und C.P. Emerson, Jr. 2006a. Protein kinase C-delta and mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase-1 control GLI activation in hedgehog signaling. *Cancer research*. 66:839-845.
- Riobo, N.A. und D.R. Manning. 2007. Pathways of signal transduction employed by vertebrate Hedgehogs. *The Biochemical journal*. 403:369-379.
- Riobo, N.A., B. Saucy, C. Dilizio und D.R. Manning. 2006b. Activation of heterotrimeric G proteins by Smoothed. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103:12607-12612.

- Robbins, D.J., D.L. Fei und N.A. Riobo. 2012. The Hedgehog signal transduction network. *Science signaling*. 5:re6.
- Roessler, E., E. Belloni, K. Gaudenz, P. Jay, P. Berta, S.W. Scherer, L.C. Tsui und M. Muenke. 1996. Mutations in the human Sonic Hedgehog gene cause holoprosencephaly. *Nature genetics*. 14:357-360.
- Rohatgi, R., L. Milenkovic und M.P. Scott. 2007. Patched1 regulates hedgehog signaling at the primary cilium. *Science*. 317:372-376.
- Roof, D.J., A. Hayes, M. Adamian, A.H. Chishti und T. Li. 1997. Molecular characterization of abLIM, a novel actin-binding and double zinc finger protein. *The Journal of cell biology*. 138:575-588.
- Rottem, S. und Y. Naot. 1998. Subversion and exploitation of host cells by mycoplasmas. *Trends in microbiology*. 6:436-440.
- Routh, M.D., Y. Zalucki, C.C. Su, Q. Zhang, W.M. Shafer und E.W. Yu. 2011. Efflux pumps of the resistance-nodulation-division family: a perspective of their structure, function, and regulation in gram-negative bacteria. *Advances in enzymology and related areas of molecular biology*. 77:109-146.
- Ruiz i Altaba, A. 1999. Gli proteins encode context-dependent positive and negative functions: implications for development and disease. *Development*. 126:3205-3216.
- Ruppert, J.M., K.W. Kinzler, A.J. Wong, S.H. Bigner, F.T. Kao, M.L. Law, H.N. Seunemann, S.J. O'Brien und B. Vogelstein. 1988. The GLI-Kruppel family of human genes. *Molecular and cellular biology*. 8:3104-3113.
- Ryoo, S.R., H.K. Jeong, C. Radnaabazar, J.J. Yoo, H.J. Cho, H.W. Lee, I.S. Kim, Y.H. Cheon, Y.S. Ahn, S.H. Chung und W.J. Song. 2007. DYRK1A-mediated hyperphosphorylation of Tau. A functional link between Down syndrome and Alzheimer disease. *The Journal of biological chemistry*. 282:34850-34857.
- Sanders, T.A., E. Llagostera und M. Barna. 2013. Specialized filopodia direct long-range transport of SHH during vertebrate tissue patterning. *Nature*. 497:628-632.
- Sasaki, H., C. Hui, M. Nakafuku und H. Kondoh. 1997. A binding site for Gli proteins is essential for HNF-3beta floor plate enhancer activity in transgenics and can respond to Shh in vitro. *Development*. 124:1313-1322.
- Sasazuki, T., T. Sawada, S. Sakon, T. Kitamura, T. Kishi, T. Okazaki, M. Katano, M. Tanaka, M. Watanabe, H. Yagita, K. Okumura und H. Nakano. 2002. Identification of a novel transcriptional activator, BSAC, by a functional cloning to inhibit tumor necrosis factor-induced cell death. *The Journal of biological chemistry*. 277:28853-28860.
- Scales, S.J. und F.J. de Sauvage. 2009. Mechanisms of Hedgehog pathway activation in cancer and implications for therapy. *Trends in pharmacological sciences*. 30:303-312.
- Scales, T.M., S. Lin, M. Kraus, R.G. Goold und P.R. Gordon-Weeks. 2009. Nonprimed and DYRK1A-primed GSK3 beta-phosphorylation sites on MAP1B regulate microtubule dynamics in growing axons. *Journal of cell science*. 122:2424-2435.
- Schmeichel, K.L. und M.C. Beckerle. 1994. The LIM domain is a modular protein-binding interface. *Cell*. 79:211-219.
- Schneeberger, C., P. Speiser, F. Kury und R. Zeillinger. 1995. Quantitative detection of reverse transcriptase-PCR products by means of a novel and sensitive DNA stain. *PCR methods and applications*. 4:234-238.
- Seifert, A., L.A. Allan und P.R. Clarke. 2008. DYRK1A phosphorylates caspase 9 at an inhibitory site and is potently inhibited in human cells by harmine. *The FEBS journal*. 275:6268-6280.
- Seifert, A. und P.R. Clarke. 2009. p38alpha- and DYRK1A-dependent phosphorylation of caspase-9 at an inhibitory site in response to hyperosmotic stress. *Cellular signalling*. 21:1626-1633.
- Selvaraj, A. und R. Prywes. 2003. Megakaryoblastic leukemia-1/2, a transcriptional co-activator of serum response factor, is required for skeletal myogenic differentiation. *The Journal of biological chemistry*. 278:41977-41987.

- Selvaraj, A. und R. Prywes. 2004. Expression profiling of serum inducible genes identifies a subset of SRF target genes that are MKL dependent. *BMC molecular biology*. 5:13.
- Sepulveda, J.L., S. Vlahopoulos, D. Iyer, N. Belaguli und R.J. Schwartz. 2002. Combinatorial expression of GATA4, Nkx2-5, and serum response factor directs early cardiac gene activity. *The Journal of biological chemistry*. 277:25775-25782.
- Shakir, M.A., K. Jiang, E.C. Struckhoff, R.S. Demarco, F.B. Patel, M.C. Soto und E.A. Lundquist. 2008. The Arp2/3 activators WAVE and WASP have distinct genetic interactions with Rac GTPases in *Caenorhabditis elegans* axon guidance. *Genetics*. 179:1957-1971.
- Shaw, P.E., H. Schroter und A. Nordheim. 1989. The ability of a ternary complex to form over the serum response element correlates with serum inducibility of the human c-fos promoter. *Cell*. 56:563-572.
- Sheng, T., S. Chi, X. Zhang und J. Xie. 2006. Regulation of Gli1 localization by the cAMP/protein kinase A signaling axis through a site near the nuclear localization signal. *The Journal of biological chemistry*. 281:9-12.
- Shi, J., T. Zhang, C. Zhou, M.O. Chohan, X. Gu, J. Wegiel, J. Zhou, Y.W. Hwang, K. Iqbal, I. Grundke-Iqbal, C.X. Gong und F. Liu. 2008. Increased dosage of Dyrk1A alters alternative splicing factor (ASF)-regulated alternative splicing of tau in Down syndrome. *The Journal of biological chemistry*. 283:28660-28669.
- Shimokawa, T., M.F. Rahman, U. Tostar, E. Sonkoly, M. Stahle, A. Pivarcsi, R. Palaniswamy und P.G. Zaphiropoulos. 2013. RNA editing of the GLI1 transcription factor modulates the output of Hedgehog signaling. *RNA biology*. 10:321-333.
- Shimokawa, T., U. Tostar, M. Lauth, R. Palaniswamy, M. Kasper, R. Toftgard und P.G. Zaphiropoulos. 2008. Novel human glioma-associated oncogene 1 (GLI1) splice variants reveal distinct mechanisms in the terminal transduction of the hedgehog signal. *The Journal of biological chemistry*. 283:14345-14354.
- Shin, K., J. Lee, N. Guo, J. Kim, A. Lim, L. Qu, I.U. Mysorekar und P.A. Beachy. 2011. Hedgehog/Wnt feedback supports regenerative proliferation of epithelial stem cells in bladder. *Nature*. 472:110-114.
- Shuman, S. 1994. Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. *The Journal of biological chemistry*. 269:32678-32684.
- Sitz, J.H., M. Tigges, K. Baumgartel, L.G. Khaspekov und B. Lutz. 2004. Dyrk1A potentiates steroid hormone-induced transcription via the chromatin remodeling factor Arip4. *Molecular and cellular biology*. 24:5821-5834.
- Small, E.M. 2012. The actin-MRTF-SRF gene regulatory axis and myofibroblast differentiation. *Journal of cardiovascular translational research*. 5:794-804.
- Small, J.V., K. Rottner und I. Kaverina. 1999. Functional design in the actin cytoskeleton. *Current opinion in cell biology*. 11:54-60.
- Somogyi, K. und P. Rorth. 2004. Evidence for tension-based regulation of Drosophila MAL and SRF during invasive cell migration. *Developmental cell*. 7:85-93.
- Soon, P.S., A.J. Gill, D.E. Benn, A. Clarkson, B.G. Robinson, K.L. McDonald und S.B. Sidhu. 2009. Microarray gene expression and immunohistochemistry analyses of adrenocortical tumors identify IGF2 and Ki-67 as useful in differentiating carcinomas from adenomas. *Endocrine-related cancer*. 16:573-583.
- Sotiropoulos, A., D. Gineitis, J. Copeland und R. Treisman. 1999. Signal-regulated activation of serum response factor is mediated by changes in actin dynamics. *Cell*. 98:159-169.
- Soundararajan, M., A.K. Roos, P. Savitsky, P. Filippakopoulos, A.N. Kettenbach, J.V. Olsen, S.A. Gerber, J. Eswaran, S. Knapp und J.M. Elkins. 2013. Structures of Down syndrome kinases, DYRKs, reveal mechanisms of kinase activation and substrate recognition. *Structure*. 21:986-996.
- Stecca, B., C. Mas, V. Clement, M. Zbinden, R. Correa, V. Piguet, F. Beermann und I.A.A. Ruiz. 2007. Melanomas require HEDGEHOG-GLI signaling regulated by interactions between GLI1 and the RAS-MEK/AKT pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104:5895-5900.

- Stecca, B. und A. Ruiz i Altaba. 2009. A Gli1-p53 inhibitory loop controls neural stem cell and tumour cell numbers. *The EMBO journal*. 28:663-676.
- Stegmann, T.J. 1998. FGF-1: a human growth factor in the induction of neoangiogenesis. *Expert opinion on investigational drugs*. 7:2011-2015.
- Stevens, J., A. Ermakov, J. Braganca, H. Hilton, P. Underhill, S. Bhattacharya, N.A. Brown und D.P. Norris. 2010. Analysis of the asymmetrically expressed Ablim1 locus reveals existence of a lateral plate Nodal-independent left sided signal and an early, left-right independent role for nodal flow. *BMC developmental biology*. 10:54.
- Stone, D.M., M. Hynes, M. Armanini, T.A. Swanson, Q. Gu, R.L. Johnson, M.P. Scott, D. Pennica, A. Goddard, H. Phillips, M. Noll, J.E. Hooper, F. de Sauvage und A. Rosenthal. 1996. The tumour-suppressor gene patched encodes a candidate receptor for Sonic hedgehog. *Nature*. 384:129-134.
- Stone, D.M., M. Murone, S. Luoh, W. Ye, M.P. Armanini, A. Gurney, H. Phillips, J. Brush, A. Goddard, F.J. de Sauvage und A. Rosenthal. 1999. Characterization of the human suppressor of fused, a negative regulator of the zinc-finger transcription factor Gli. *Journal of cell science*. 112 (Pt 23):4437-4448.
- Strutt, H., C. Thomas, Y. Nakano, D. Stark, B. Neave, A.M. Taylor und P.W. Ingham. 2001. Mutations in the sterol-sensing domain of Patched suggest a role for vesicular trafficking in Smoothened regulation. *Current biology : CB*. 11:608-613.
- Su, Y., J.K. Ospina, J. Zhang, A.P. Michelson, A.M. Schoen und A.J. Zhu. 2011. Sequential phosphorylation of smoothened transduces graded hedgehog signaling. *Science signaling*. 4:ra43.
- Sum, E.Y., B. Peng, X. Yu, J. Chen, J. Byrne, G.J. Lindeman und J.E. Visvader. 2002. The LIM domain protein LMO4 interacts with the cofactor CtIP and the tumor suppressor BRCA1 and inhibits BRCA1 activity. *The Journal of biological chemistry*. 277:7849-7856.
- Sun, Y., K. Boyd, W. Xu, J. Ma, C.W. Jackson, A. Fu, J.M. Shillingford, G.W. Robinson, L. Hennighausen, J.K. Hitzler, Z. Ma und S.W. Morris. 2006. Acute myeloid leukemia-associated Mkl1 (Mrtf-a) is a key regulator of mammary gland function. *Molecular and cellular biology*. 26:5809-5826.
- Svard, J., K. Heby-Henricson, M. Persson-Lek, B. Rozell, M. Lauth, A. Bergstrom, J. Ericson, R. Toftgard und S. Teglund. 2006. Genetic elimination of Suppressor of fused reveals an essential repressor function in the mammalian Hedgehog signaling pathway. *Developmental cell*. 10:187-197.
- Taipale, J., J.K. Chen, M.K. Cooper, B. Wang, R.K. Mann, L. Milenkovic, M.P. Scott und P.A. Beachy. 2000. Effects of oncogenic mutations in Smoothened and Patched can be reversed by cyclopamine. *Nature*. 406:1005-1009.
- Taipale, J., M.K. Cooper, T. Maiti und P.A. Beachy. 2002. Patched acts catalytically to suppress the activity of Smoothened. *Nature*. 418:892-897.
- Taira, N., R. Mimoto, M. Kurata, T. Yamaguchi, M. Kitagawa, Y. Miki und K. Yoshida. 2012. DYRK2 priming phosphorylation of c-Jun and c-Myc modulates cell cycle progression in human cancer cells. *The Journal of clinical investigation*. 122:859-872.
- Taira, N., K. Nihira, T. Yamaguchi, Y. Miki und K. Yoshida. 2007. DYRK2 is targeted to the nucleus and controls p53 via Ser46 phosphorylation in the apoptotic response to DNA damage. *Molecular cell*. 25:725-738.
- Taira, N., H. Yamamoto, T. Yamaguchi, Y. Miki und K. Yoshida. 2010. ATM augments nuclear stabilization of DYRK2 by inhibiting MDM2 in the apoptotic response to DNA damage. *The Journal of biological chemistry*. 285:4909-4919.
- Therond, P.P. 2012. Release and transportation of Hedgehog molecules. *Current opinion in cell biology*. 24:173-180.
- Thibert, C., M.A. Teillet, F. Lapointe, L. Mazelin, N.M. Le Douarin und P. Mehlen. 2003. Inhibition of neuroepithelial patched-induced apoptosis by sonic hedgehog. *Science*. 301:843-846.
- Treisman, R. 1986. Identification of a protein-binding site that mediates transcriptional response of the c-fos gene to serum factors. *Cell*. 46:567-574.

- Tukachinsky, H., R.P. Kuzmickas, C.Y. Jao, J. Liu und A. Salic. 2012. Dispatched and scube mediate the efficient secretion of the cholesterol-modified hedgehog ligand. *Cell reports*. 2:308-320.
- Tukachinsky, H., L.V. Lopez und A. Salic. 2010. A mechanism for vertebrate Hedgehog signaling: recruitment to cilia and dissociation of SuFu-Gli protein complexes. *The Journal of cell biology*. 191:415-428.
- Tuson, M., M. He und K.V. Anderson. 2011. Protein kinase A acts at the basal body of the primary cilium to prevent Gli2 activation and ventralization of the mouse neural tube. *Development*. 138:4921-4930.
- van den Brink, G.R. 2007. Hedgehog signaling in development and homeostasis of the gastrointestinal tract. *Physiological reviews*. 87:1343-1375.
- van den Heuvel, M. und P.W. Ingham. 1996. smoothened encodes a receptor-like serpentine protein required for hedgehog signalling. *Nature*. 382:547-551.
- Varjosalo, M., M. Bjorklund, F. Cheng, H. Syvanen, T. Kivioja, S. Kilpinen, Z. Sun, O. Kallioniemi, H.G. Stunnenberg, W.W. He, P. Ojala und J. Taipale. 2008. Application of active and kinase-deficient kinome collection for identification of kinases regulating hedgehog signaling. *Cell*. 133:537-548.
- Vartiainen, M.K., S. Guettler, B. Larijani und R. Treisman. 2007. Nuclear actin regulates dynamic subcellular localization and activity of the SRF cofactor MAL. *Science*. 316:1749-1752.
- Wang, B., J.F. Fallon und P.A. Beachy. 2000. Hedgehog-regulated processing of Gli3 produces an anterior/posterior repressor gradient in the developing vertebrate limb. *Cell*. 100:423-434.
- Wang, B. und Y. Li. 2006. Evidence for the direct involvement of {beta}TrCP in Gli3 protein processing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103:33-38.
- Wang, C., Y. Pan und B. Wang. 2010. Suppressor of fused and Spop regulate the stability, processing and function of Gli2 and Gli3 full-length activators but not their repressors. *Development*. 137:2001-2009.
- Wang, D., P.S. Chang, Z. Wang, L. Sutherland, J.A. Richardson, E. Small, P.A. Krieg und E.N. Olson. 2001. Activation of cardiac gene expression by myocardin, a transcriptional cofactor for serum response factor. *Cell*. 105:851-862.
- Wang, D.Z., S. Li, D. Hockemeyer, L. Sutherland, Z. Wang, G. Schratt, J.A. Richardson, A. Nordheim und E.N. Olson. 2002. Potentiation of serum response factor activity by a family of myocardin-related transcription factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 99:14855-14860.
- Wang, J., H. Chen, A. Seth und C.A. McCulloch. 2003. Mechanical force regulation of myofibroblast differentiation in cardiac fibroblasts. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*. 285:H1871-1881.
- Wegiel, J., I. Kuchna, K. Nowicki, J. Frackowiak, K. Dowjat, W.P. Silverman, B. Reisberg, M. DeLeon, T. Wisniewski, T. Adayev, M.C. Chen-Hwang und Y.W. Hwang. 2004. Cell type- and brain structure-specific patterns of distribution of minibrain kinase in human brain. *Brain research*. 1010:69-80.
- Wei, Y., C.A. Renard, C. Labalette, Y. Wu, L. Levy, C. Neuveut, X. Prieur, M. Flajolet, S. Prigent und M.A. Buendia. 2003. Identification of the LIM protein FHL2 as a coactivator of beta-catenin. *The Journal of biological chemistry*. 278:5188-5194.
- Wen, X., C.K. Lai, M. Evangelista, J.A. Hongo, F.J. de Sauvage und S.J. Scales. 2010. Kinetics of hedgehog-dependent full-length Gli3 accumulation in primary cilia and subsequent degradation. *Molecular and cellular biology*. 30:1910-1922.
- Wiechmann, S., H. Czajkowska, K. de Graaf, J. Grotzinger, H.G. Joost und W. Becker. 2003. Unusual function of the activation loop in the protein kinase DYRK1A. *Biochemical and biophysical research communications*. 302:403-408.

- Wigley, W.C., R.P. Fabunmi, M.G. Lee, C.R. Marino, S. Muallem, G.N. DeMartino und P.J. Thomas. 1999. Dynamic association of proteasomal machinery with the centrosome. *The Journal of cell biology*. 145:481-490.
- Wilson, C.W., M.H. Chen und P.T. Chuang. 2009. Smoothed adopts multiple active and inactive conformations capable of trafficking to the primary cilium. *PloS one*. 4:e5182.
- Wilson, C.W. und P.T. Chuang. 2010. Mechanism and evolution of cytosolic Hedgehog signal transduction. *Development*. 137:2079-2094.
- Witt, R.M., M.L. Hecht, M.F. Pazyra-Murphy, S.M. Cohen, C. Noti, T.H. van Kuppevelt, M. Fuller, J.A. Chan, J.J. Hopwood, P.H. Seeberger und R.A. Segal. 2013. Heparan sulfate proteoglycans containing a glypican 5 core and 2-O-sulfo-iduronic acid function as Sonic Hedgehog co-receptors to promote proliferation. *The Journal of biological chemistry*. 288:26275-26288.
- Wixler, V., S. Hirner, J.M. Muller, L. Gullotti, C. Will, J. Kirfel, T. Gunther, H. Schneider, A. Bosserhoff, H. Schorle, J. Park, R. Schule und R. Buettner. 2007. Deficiency in the LIM-only protein Fhl2 impairs skin wound healing. *The Journal of cell biology*. 177:163-172.
- Xie, J., M. Murone, S.M. Luoh, A. Ryan, Q. Gu, C. Zhang, J.M. Bonifas, C.W. Lam, M. Hynes, A. Goddard, A. Rosenthal, E.H. Epstein, Jr. und F.J. de Sauvage. 1998. Activating Smoothed mutations in sporadic basal-cell carcinoma. *Nature*. 391:90-92.
- Yam, P.T., S.D. Langlois, S. Morin und F. Charron. 2009. Sonic hedgehog guides axons through a noncanonical, Src-family-kinase-dependent signaling pathway. *Neuron*. 62:349-362.
- Yamashita, S., M. Chujo, T. Moroga, K. Anami, K. Tokuishi, M. Miyawaki, Y. Kawano, S. Takeno, S. Yamamoto und K. Kawahara. 2009a. DYRK2 expression may be a predictive marker for chemotherapy in non-small cell lung cancer. *Anticancer research*. 29:2753-2757.
- Yamashita, S., M. Chujo, K. Tokuishi, K. Anami, M. Miyawaki, S. Yamamoto und K. Kawahara. 2009b. Expression of dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation-regulated kinase 2 (DYRK2) can be a favorable prognostic marker in pulmonary adenocarcinoma. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. 138:1303-1308.
- Yang, C., W. Chen, Y. Chen und J. Jiang. 2012. Smoothed transduces Hedgehog signal by forming a complex with Evc/Evc2. *Cell research*. 22:1593-1604.
- Yang, L., G. Xie, Q. Fan und J. Xie. 2010. Activation of the hedgehog-signaling pathway in human cancer and the clinical implications. *Oncogene*. 29:469-481.
- Yang, Y. und E.A. Lundquist. 2005. The actin-binding protein UNC-115/abLIM controls formation of lamellipodia and filopodia and neuronal morphogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Molecular and cellular biology*. 25:5158-5170.
- Yauch, R.L., S.E. Gould, S.J. Scales, T. Tang, H. Tian, C.P. Ahn, D. Marshall, L. Fu, T. Januario, D. Kallop, M. Nannini-Pepe, K. Kotkow, J.C. Marsters, L.L. Rubin und F.J. de Sauvage. 2008. A paracrine requirement for hedgehog signalling in cancer. *Nature*. 455:406-410.
- Yavari, A., R. Nagaraj, E. Owusu-Ansah, A. Folick, K. Ngo, T. Hillman, G. Call, R. Rohatgi, M.P. Scott und U. Banerjee. 2010. Role of lipid metabolism in smoothed derepression in hedgehog signaling. *Developmental cell*. 19:54-65.
- Ye, W., K. Shimamura, J.L. Rubenstein, M.A. Hynes und A. Rosenthal. 1998. FGF and Shh signals control dopaminergic and serotonergic cell fate in the anterior neural plate. *Cell*. 93:755-766.
- Zeng, H., J. Jia und A. Liu. 2010. Coordinated translocation of mammalian Gli proteins and suppressor of fused to the primary cilium. *PloS one*. 5:e15900.
- Zhan, X., X. Shi, Z. Zhang, Y. Chen und J.I. Wu. 2011. Dual role of Brg chromatin remodeling factor in Sonic hedgehog signaling during neural development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 108:12758-12763.
- Zhang, D., K. Li, C.L. Erickson-Miller, M. Weiss und D.M. Wojchowski. 2005. DYRK gene structure and erythroid-restricted features of DYRK3 gene expression. *Genomics*. 85:117-130.
- Zhang, M., H. Fang, J. Zhou und B.P. Herring. 2007. A novel role of Brg1 in the regulation of SRF/MRTFA-dependent smooth muscle-specific gene expression. *The Journal of biological chemistry*. 282:25708-25716.

- Zhang, Q., Q. Shi, Y. Chen, T. Yue, S. Li, B. Wang und J. Jiang. 2009. Multiple Ser/Thr-rich degrons mediate the degradation of Ci/Gli by the Cul3-HIB/SPOP E3 ubiquitin ligase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 106:21191-21196.
- Zhao, X.H., C. Laschinger, P. Arora, K. Szaszi, A. Kapus und C.A. McCulloch. 2007a. Force activates smooth muscle alpha-actin promoter activity through the Rho signaling pathway. *Journal of cell science*. 120:1801-1809.
- Zhao, Y., C. Tong und J. Jiang. 2007b. Hedgehog regulates smoothened activity by inducing a conformational switch. *Nature*. 450:252-258.
- Zheng, G., Y. Tao, W. Yu und R.J. Schwartz. 2013. Brief report: SRF-dependent MiR-210 silences the sonic hedgehog signaling during cardiopoiesis. *Stem cells*. 31:2279-2285.
- Zhu, A.J. und M.P. Scott. 2004. Incredible journey: how do developmental signals travel through tissue? *Genes & development*. 18:2985-2997.
- Zou, Y., D.Z. Ewton, X. Deng, S.E. Mercer und E. Friedman. 2004. Mirk/dyrk1B kinase destabilizes cyclin D1 by phosphorylation at threonine 288. *The Journal of biological chemistry*. 279:27790-27798.

11 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren in Marburg Adamkiewicz, Lauth, Meißner, Müller, Müller-Brüsselbach, in Frankfurt am Main Acker-Palmer, Aßmus, Averhoff, Bereiter-Hahn, Bode, Boles, Brüggemann, Büchel, Engels, Entian, Fauth, Fuchs, Gaese, Geißlinger, Gholami, Gnatzy, Grünewald, Hamann, Hertler, Kleinod, Klussmann-Kolb, Koeniger, Kolbesen, Kössl, Müller, Niederberger, Nover, Oehlmann, Osiewacz, Pfennig, Piepenbring, Plassmann, Prinzinger, Russ, Sandmann, Scharf, Schleiff, Schleucher, Schmidt, Schneider, Schrenk, Seyfarth, Soppa, Starzinski-Powitz, Streit, Tackenberg, Tenhaken, Trömel, Türkay, von Koskull-Döring, Weil, Weßler, Winter, Wittig, Zimmermann, Zizka.

12 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Dr. Matthias Lauth für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu können, bedanken. Die fachkundige Betreuung sowie die spannenden Diskussionen haben maßgeblich zu dieser Arbeit beigetragen.

Besonderer Dank gilt Frau Dr. Verena Rohnalter für ihr schnelles und zuverlässiges Korrekturlesen und allen anderen derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Lauth, die mich während meiner Zeit in dieser Gruppe begleitet haben, vor allem aber Philipp Holz, Pavan Kumar, Melanie Tariki und Bernhard Wilke.

Auch allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppen Heyd und Müller möchte ich für die stets angenehme Zusammenarbeit innerhalb und außerhalb des Labors danken. Eine Liste der Namen würde den Rahmen dieser Arbeit sprengen.

Ein letzter Dank geht an alle, die sich von den Begriffen Freunde und/oder Familie angesprochen fühlen, für die Unterstützung in jeglicher Hinsicht und für ihr Durchhaltevermögen.